

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

A Terapêutica Fotodinâmica e o Diagnóstico Diferencial no Tratamento e Profilaxia das Doenças de Peixes

Pedro Gonçalo Rodrigues e Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas
Abel Salazar da Universidade do Porto – Ciências do Mar e Recursos
Marinhos

Pedro Gonçalo Rodrigues e Silva

A TERAPÊUTICA FOTODINÂMICA E O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL NO TRATAMENTO E PROFILAXIA DAS DOENÇAS DE PEIXES

Dissertação de mestrado apresentada ao
ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel
Salazar da Universidade de Porto em
Ciências do Mar – Recursos Marinho –
Especialização em Aquacultura e Pescas

Orientadora – Doutora Paula Ramos

Categoria – Investigadora Auxiliar

Afiliação - Instituto Português do Mar e da
Atmosfera, IPMA, IP

Lista de abreviaturas

µm - micrómetro

ADN – Ácido desoxirribonucleico

APA – Agência Portuguesa do Ambiente

aPDT – Antimicrobial Photodynamic Therapy

ASABE – American Society of Agricultural and Biological Engineers

CE – Comunidade Europeia

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DGS – Direção Geral de Saúde

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO – Food and Alimentation Organization

FDA – Food and Drug Association

HD – Hospedeiro Definitivo

HI – Hospedeiro Intermediário

HIV – Human immunodeficiency Virus

IgE – Imunoglobulina E

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

L1 – Primeiro estágio larvar

L2 – Segundo estágio larvar

L3 – Terceiro estágio larvar

L4 – Quarto estágio larvar

ml - mililitro

ONU – Organização das Nações Unidas

PS – Fotossensibilizador

RBA – Rapid Biological Assessment

s. l. – *sensu latum*

Agradecimentos

A todos aqueles que estiveram comigo durante este ano em que tive a oportunidade de trabalhar nesta dissertação eu deixo o meu mais sincero obrigado. Foram tempos difíceis e com vocês cada dia foi mais fácil de superar.

Em especial quero agradecer à minha orientadora, Doutora Paula Ramos, por me ter acolhido neste projeto e me ter guiado neste caminho. Por me ter ajudado a crescer da melhor forma a cada dia.

À Dra. Ana Grade, por me ter ajudado todos os dias e me ter acompanhado todos os dias desta jornada no laboratório.

À Professora Fernanda Malhão, Professora Célia Lopes e ao Miguel por me terem ajudado nesta reta final. Pelo apoio e auxílio.

Aos meus amigos, que sempre estiveram próximos estando longe. Estar longe é difícil mas quando temos amigos, a nossa “casa” fica mais perto.

Às minhas irmãs, Alda e Sofia, por me terem dado a mão em qualquer altura, me terem ajudado em tudo o que era possível. Serem incansáveis em tornarem melhor pessoa.

À namorada, Cláudia, por incansavelmente ter estado ao meu lado e pelo apoio incondicional. Por ter aturado a minha má disposição e me fazer crescer a cada dia.

Aos meus pais, aos quais dedico este trabalho, pelo esforço e dedicação, pelo apoio e carinho que me deram todos os dias em que estive longe deles. Obrigado por me fazerem melhor a cada dia.

Índice

1. Lista de Abreviaturas	5
2. Agradecimentos	6
3. 1ª Parte	
a. Resumo/Abstract	10
b. Objetivos	12
c. Introdução e Pescas	
i. Atualidade em Aquacultura e Pescas	13
ii. Controlo Sanitário	14
d. Parasita – <i>Anisakis simplex sensu latum</i>	
i. Descrição e Ciclo de Vida	16
ii. Morfologia	17
iii. Importância do parasita para a saúde pública	19
e. Terapia Fotodinâmica	
i. Conceito	21
ii. Estado de Arte	22
iii. Porfirinas	23
f. Material e Métodos	28
g. Exame histopatológico	29
h. Resultados	30
i. Discussão	33
j. Conclusão	35
k. Bibliografia	36
4. 2ª Parte	
a. Resumo/Abstract	49
b. Objetivos	51
c. Introdução	52
d. Descrição do Local	52
e. Relato da parasitose	53
f. Caracterização da Espécie	
i. <i>Alburnus alburnus</i>	54
ii. <i>Ligula intestinalis</i>	55
iii. <i>Diphyllbothrium</i>	57
g. Materiais e Métodos	60
h. Exame histopatológico	60

i. Resultados	
i. Amostra de Inverno	62
ii. Amostra de Primavera	65
j. Discussão	69
k. Conclusão	71
l. Bibliografia	72
m. Anexo I	79

Estudo Histopatológico para Avaliação do Efeito da Terapia Fotodinâmica na Inativação de Anisaquídeos

Resumo

O nemátodo parasita *Anisakis simplex* s. l. é um agente patogénico para o homem, capaz de provocar infeção e reações alérgicas, incluindo choque anafilático, após o consumo de peixe infetado com o parasita vivo. A terapia fotodinâmica resulta da interação da luz com um composto não tóxico, por exemplo, a porfirina e o oxigénio que está presente nos tecidos dos organismos.

Neste estudo, pretendem-se através do exame histopatológico, estudar as alterações morfológicas nos parasitas e assim, avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica na inativação de parasitas do género *Anisakis*. Nos ensaios realizados chegou-se à conclusão que a utilização da solução de porfirina catiónica com uma concentração de 5 µm e a incidência de luz branca de 4 mW/cm² não inativou as larvas de *Anisakis* enquanto que a utilização da solução de porfirina catiónica com uma concentração de 50 µm e a incidência de luz branca de 14 mW/cm² foi eficaz na inativação das larvas. Os parasitas mortos apresentaram alterações no intestino, alargamento do lúmen intestinal e lesões degenerativas do intestino. Mais estudos deverão ser desenvolvidos com vista à aplicação da terapia Fotodinâmica na prevenção e tratamento das doenças causadas por parasitas do género *Anisakis* e sua aplicabilidade em aquacultura.

Abstract

The nematode *Anisakis simplex* s. l. is a pathogenic parasite for humans and can cause infection and allergic reactions, including anaphylactic shock after eating fish infected with viable parasites. Photodynamic therapy results from the interaction of light with a non-toxic compound (e.g. porphyrin) and oxygen that is present in the tissues of the organisms.

In this study, it is intended by histopathology, to study the morphological changes in parasites and thus evaluate the efficacy of the photodynamic therapy to inactivate parasites of the genus *Anisakis*. We conclude that with the use of porphyrin cation solution with a concentration of 5 μm and the incidence of white light 4 mW / cm^2 larvae *Anisakis* were not inactivated and the use of porphyrin cation solution with a concentration of 50 μm and incidence of white light 14 mW/cm^2 was effective and inactivate larvae. The dead parasites showed changes in the intestine, enlargement of the intestinal lumen and intestinal alterations. More studies should be developed for the application of photodynamic therapy in the prevention and treatment of diseases caused by parasites of the genus *Anisakis* and its use in aquaculture.

Objetivos

Este capítulo tem como objetivo principal o estudo das alterações morfológicas do parasita *Anisakis simplex* s. l. através do exame histopatológico de dois grupo de parasitas tratados com soluções de porfirina em diferentes concentrações e diferentes intensidades de luz. Desta forma pretendeu-se avaliar o efeito da aplicação das porfirinas através da terapia fotodinâmica na inviabilização de anisaquídeos.

Introdução

Atualidade da Aquacultura e Pescas

A aquacultura é a atividade económica que compreende os tipos de cultura de animais e de plantas aquáticas em ambientes de água doce, salobra e marinhos. Existem alguns tipos de sistemas de produção, tais como as jaulas que estão em zonas *offshore* e em lagoas, os tanques de terra e os tanques de produção em sistema intensivo ou semi-intensivo (ASABE, 2009; FAO, 2012; New Economics Foundation, 2014; FAO, 2014(d)).

A aquacultura *offshore* é muitas vezes usada para a produção de salmão, dourada, corvina entre outras espécies. A aquacultura em terra é usada para a produção de uma variedade de peixes ósseos, como bagres, savelhas, tilápia, robalos e douradas. Nas aquaculturas *offshore* ou em lagoas costeiras há maior risco de transmissão de infeções do que em sistemas fechados, pois é um sistema aberto em que a água está em constante circulação (Jhingran, 1987; FAO, 1988; FAO, 2009).

As aquaculturas em sistemas fechados ou em sistemas de recirculação têm a vantagem de não estar em contacto com o ambiente e não ter que estar em estreita proximidade com o mar. A aquacultura fornece quase um terço da oferta de pescado do mundo e é um dos setores da economia com maior crescimento (FAO, 1988, Thacker, 2008; Almeida et al., 2009; ASABE, 2009). Nos últimos dez anos, a produção da aquacultura tem aumentado, em média, 6% ao ano. A produção aumentou de 8,7 milhões de toneladas de peixe em 1990, para 31,6 milhões de toneladas em 2006 (FAO, 2011; New Economics Foundation, 2014).

A produção de pescado em 2002 foi superior a 94 milhões de toneladas pela atividade extrativa e mais 50 milhões de toneladas pela aquacultura. (FAO, 2002) Estima-se que o pescado consiga garantir cerca de 16% da proteína consumida pelo Homem (Embrapa, 2008; FAO, 2014). Segundo a agência da ONU para agricultura e alimentação, as exportações alcançaram o valor de 136 mil milhões de dólares em 2013; o que reflete o forte crescimento da aquacultura e os altos preços de várias espécies de peixes, como o salmão e o camarão (Comunidade Europeia, 2014; FAO, 2014). Em 2013, segundo a FAO, a produção global de peixe tanto na pesca como em aquacultura atingiu um novo recorde, cerca de 160 milhões de toneladas. Desde 1950, a captura de peixes quintuplicou de 18 para 100 milhões de toneladas por ano. Entretanto os números não param de aumentar. O sector piscícola contribui de forma

significativa para a criação de postos de emprego, e consequentemente para o melhoramento da economia mundial (Comunidade Europeia, 2014; FAO, 2014).

As pisciculturas muitas vezes sofrem pesadas perdas financeiras, devido ao desenvolvimento de infeções causadas por alguns agentes patogénicos, que são facilmente disseminados através da água e, portanto, capazes de infetar uma grande variedade de espécies de peixes (Thacker, 2008; FAO, 2009; ASABE, 2009; FAO, 2014). Estes agentes patogénicos podem ser bactérias, vírus ou parasitas. Todos estes agentes podem tornar-se resistentes, o que dificulta a sua eliminação (FDA, 2011; DGS, 2012). São utilizadas vacinas e outros medicamentos, mas nem sempre são os mais eficazes (Jhingran, 1987; DGS, 2012). Na maior parte das ocasiões, as situações de infeção parasitária podem ser evitadas através da implementação de medidas de profilaxia e de manutenção dos sistemas para se evitar o aparecimento de parasitas ou outros agentes patogénicos (Huntingford et al., 2006; FDA, 2011).

A alimentação também tem um papel importante neste aspeto. Um animal que está bem nutrido é menos suscetível de ser infetado por agentes patogénicos (ASABE, 2009; FDA, 2011; DGS, 2012).

Controlo Sanitário

A prevenção das doenças é a opção mais eficaz em termos de custos no que diz respeito às doenças nas atividades de produção aquícola. No entanto, isso nem sempre é mais viável economicamente (Hurst, 1984; Almeida et al., 2009). Deve-se manter os peixes sob condições ótimas e assegurar uma alimentação ótima, de modo a que o risco de infeções e a necessidade de técnicas de controlo biológico sejam eficazes (Thacker, 2008; DGAV, 2014).

A prevenção e controlo de infeções são especialmente difíceis em condições de criação e manutenção de peixes, devido à natureza omnipresente e de rápida disseminação de agentes patogénicos (Almeida et al., 2009). O problema é ainda mais acentuado por outros fatores, como por exemplo:

- A baixa qualidade microbiológica da água em muitos sistemas de produção de peixes;
- As condições ambientais irregulares e/ou adversas que podem atuar como agentes de predisposição para o aparecimento de doenças;
- A elevada densidade animal em piscicultura que pode diminuir a resistência às infeções, porque aumenta o *stress* e deteriora as condições do sistema;
- Os diferentes estágios no ciclo de vida dos peixes serem suscetíveis a diferentes agentes patogénicos;

- O aumento da resistência a antibióticos por bactérias patogénicas mais comuns e a preocupação sobre a disseminação de antibióticos no ambiente;
- O número significativo de esporos de agentes patogénicos que persiste na epiderme dos peixes, mesmo depois da quarentena;
- O número reduzido de medicamentos que estão licenciados para uso na aquacultura (Almeida et al., 2009).

O papel da prevenção e do controlo de doenças nos ambientes de produção é extremamente importante, pois estes peixes vão ser consumidos pelo homem e há encargos ambientais e até económicos (Thacker, 2008; FAO, 2009; FAO, 2012).

Só pelo facto de estes peixes serem consumidos pelo Homem significa que são maiores os cuidados que se devem ter no que diz respeito ao controlo parasitário e bacteriano assim como no controlo dos parâmetros ambientais. Neste aspeto, a restrição de medicamentos e vacinas que podem ser utilizados é maior e não pode haver qualquer efeito para o consumidor e também não pode ter qualquer implicação no animal, pois este constitui um produto de rentabilidade económica para a piscicultura (Huntingford, 2006; Thacker, 2008; FAO, 2009).

Nos produtos da pesca, a legislação prevê o tratamento por congelação a -20° no mínimo de 24 horas ou -35° no mínimo durante 15 horas (Regulamento (CE) nº 1276/2011, de 8 de Dezembro de 2011), importante na prevenção da infeção por parasitas do género *Anisakis* quando presentes e viáveis em produtos da pesca que se destinem a serem consumidos em cru ou pouco confecionados.

Parasita – *Anisakis Simplex sensu latum*

Descrição e Ciclo de Vida

Nemátodos do género *Anisakis* parasitam peixes de água salgada e outros animais marinhos, de entre eles mamíferos marinhos (Mattiucci et al., 2005; Hassan et al., 2013). Estes parasitas podem também parasitar o Homem, sendo este um hospedeiro acidental, causando em primeiro lugar uma infeção que posteriormente pode resultar numa reação alérgica incluindo choque anafilático depois do consumo de peixes que estejam infetados com o parasita vivo (Pascual et al., 1995; Audicana e Kennedy, 2008; Quiazon et al., 2009).

Esta parasita tem um ciclo de vida complexo (figura 1) que passa por diversos hospedeiros intermediários (Hauck e May, 1977; Audicana e Kennedy, 2008; Hassan et al., 2013). Os ovos eclodem na água do mar e são ingeridos por crustáceos planctónicos que posteriormente, são ingeridos por peixes ou moluscos, como por exemplo, as lulas (Añibarro e Seoane, 1998; Hassan et al., 2013). Nestes últimos hospedeiros, peixes ou moluscos, o parasita enquista no exterior dos órgãos viscerais ou então no músculo do animal (Carvalho-Varela, 2008; FDA, 2011).

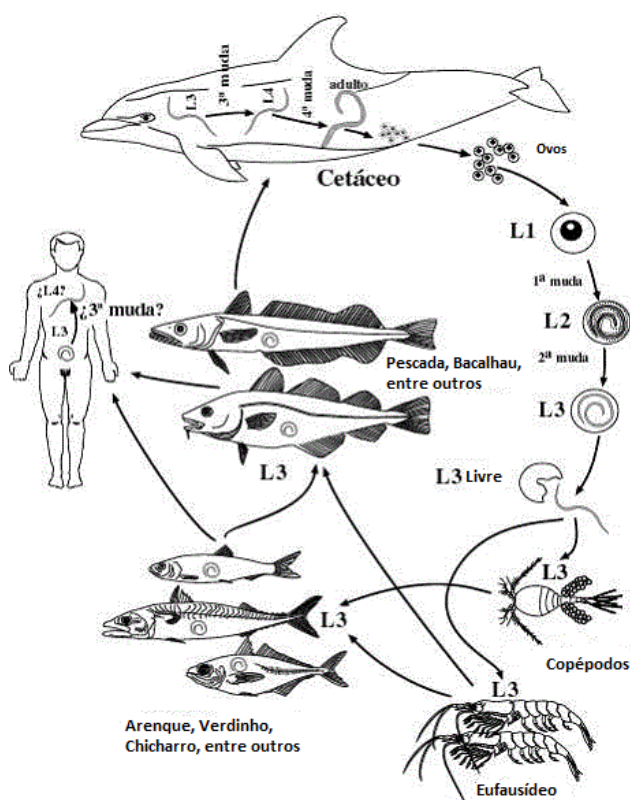


Figura 1 - Ciclo biológico de *Anisakis* (adaptado de cienciaybiologia.com)

O ciclo de vida destes parasitas completa-se quando os peixes ou as lulas são ingeridas por mamíferos marinhos superiores como o golfinho (Køie et al., 1995; Setyobudi et al., 2011). As formas larvares destes nemátodos fixam-se no intestino e alimentam-se, crescem e libertam ovos para o meio através das fezes do hospedeiro (Pascual et al, 1995; Quiazon et al., 2009).

O parasita pode infectar o Homem quando o peixe é consumido mal cozinhado ou cru (por exemplo *sushi* ou *sashimi*). Podendo causar uma infeção e/ou uma reação alérgica (Caballero et al, 2008; Karl et al., 2011; Ramos, 2011).

Nas populações ocidentais, os casos de alergia e infeção em humanos, estão muitas vezes associados a novas tendências alimentares (como *fast food*, nomeadamente *sushi* ou *sashimi*) (Mattiucci, 2005; Ramos, 2011). O consumo destes produtos em que o peixe cru esteja infetado com larvas viáveis do parasita podem constituir uma situação preocupante para a saúde pública (Hurst, 1984; FDA, 2011; Mattiucci et al., 2014).

Morfologia

O nemátodo parasita *Anisakis* tem o corpo alongado, seção arredondada e ausência de segmentação (Lehner et al., 2005). A boca está rodeada de projeções que são utilizados para localizar o alimento (Moneo et al, 2005; Mattiucci et al., 2014). O corpo do parasita está revestido de uma cutícula que lhe confere resistência à ação dos sucos digestivos (Murata et al., 2011). Os detalhes da sua morfologia variam dependendo do hospedeiro e a fase de vida em que se encontra (Murata et al., 2011; Mattiucci et al., 2014).

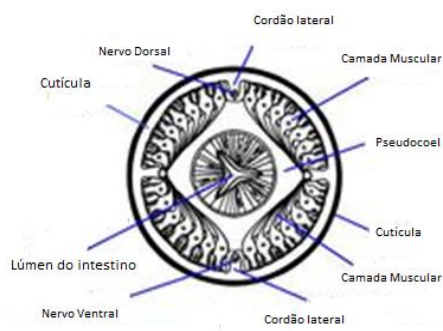


Figura 2 – Morfologia Interna de *Anisakis* (adaptado de animaldiversity.org)

Na figura 2 está representado um corte da seção transversal do parasita onde estão identificadas as estruturas internas.

Na fase que infecta os peixes, os anisquídeos encontram-se livres na cavidade abdominal ou enquistados na superfície dos órgãos viscerais ou na musculatura. Eles têm cerca de 2 cm de comprimento quando desenrolados (Silva e Eiras, 2003; Moneo et al., 2005).

Como o nome da classe indica, estes parasitas são caracterizados por apresentarem um corpo longo e esguio (Moneo et al, 2005) (figura 3). A cutícula externa confere ao parasita rigidez que juntamente com a sua musculatura, forma-se um tubo que completa o tubo digestivo central que se estende pelo corpo do parasita. O sistema digestivo é completo, começando na boca e terminando no ânus (Adoher et al., 1996; Lehner et al., 2005; Moneo et al., 2005, Berland, 2006). As larvas L3 do céstodo parasita *Anisakis* possuem uma cutícula com espessura de 12-16 µm de espessura e geralmente com diferenças entre as extremidades anterior (com abertura oral e dente perfurante) e posterior do corpo (com *mucron* e ânus) (Larizza e Vovlas, 2011).

Os adultos do género *Anisakis* apresentam, na região anterior, 3 lábios, um dorsal e dois ventro-laterais, cada um com uma projeção anterior bilobada mas sem *interlabia* (Moneo et al., 2005). Na figura 3 podemos ver alguns parasitas do género *Anisakis*.



Figura 3 - Larvas de *Anisakis simplex* s. l. (fotografia original)

Possui uma glândula excretora bem desenvolvida drenada por um ducto que conflui num poro localizado entre os lábios ventro-laterais (Connolly, 2005; Moneo et al., 2005). O esófago muscular longo une a boca ao ventrículo glandular (Moneo et al., 2005). Este último é mais comprido do que largo e frequentemente de forma sigmoide nas larvas L1. Nas larvas L2 é pequeno, não é sigmoide, por vezes em forma de violino e mais largo que comprido (Quiazon et al., 2009; Murata et al., 2011).

O ventrículo situa-se em contiguidade com a região anterior da glândula excretora, que se continua posteriormente com o intestino. Fêmeas e machos possuem sexos separados (Berland, 2006; Noguera et al., 2009; FAO, 2015).

As larvas de anisaquídeos do género *Anisakis* são comuns em peixes marinhos e anádromos (como por exemplo, salmão), e também podem ser encontradas em lulas e chocos (Silva e Eiras, 2003; Karl et al, 2011).

Em contrapartida, os parasitas estão ausentes em peixes de águas com baixa salinidade, devido às exigências fisiológicas. Os hospedeiros intermediários e definitivos são necessários para completar seu ciclo de vida. Parasitas do género *Anisakis* não são comuns em áreas onde os cetáceos são raros, como por exemplo a sul do Mar do Norte (Nunes et al, 2003; Quiazon et al., 2008; Romero et al., 2013).

Importância do parasita para a saúde pública

Os agentes zoonóticos são um problema em saúde pública. As zoonoses são doenças que podem ser transmitidas pelos animais ao Homem. Os agentes que desencadeiam este tipo de infeções podem ser microrganismos diversos, como bactérias ou parasitas (Falcão et al., 2008).

No *sushi*, *sashimi* ou outros pratos de culinária à base de peixes pouco confeccionados, há maior probabilidade de aparecimento de larvas vivas de *Anisakis*, o que pode representar um risco para a saúde humana. Os parasitas do género *Anisakis* podem produzir três tipos de alergénios, sendo estes de superfície, somáticos ou de secreção/excreção para os tecidos circundantes quando infetam um peixe e as larvas do parasita podem ser consumidas por inteiro, acidentalmente, dentro de um filete de peixe (Ramos, 2011; Audicana e Kennedy, 2008; Caballero et al, 2008).

O verdadeiro impacto de *A. simplex* como causa de síndrome alérgica aguda pode estar a ser subestimado devido à ausência de uma correlação temporal entre a ingestão de peixe parasitado e a manifestação de sintomas alérgicos (Ventura et al., 2008). Esta variabilidade está provavelmente dependente do tempo necessário para a invasão da mucosa digestiva e a secreção de alergénios excreção/secreção pela larva viva (Foti et al., 2002). Esta situação traduz-se em elevada prevalência de casos de sensibilização a *A. simplex* em indivíduos saudáveis (Del Rey Moreno et al., 2006).

Na anisquiase gástrica aguda, o tratamento consiste na remoção das larvas por endoscopia e pode ser completado com algum fármaco. Esta intervenção dependerá das complicações produzidas (Arias-Diaz et al., 2006).

A sensibilização do indivíduo é determinada por teste dérmico e a deteção é discriminada por anticorpos específicos ao *Anisakis*. A hipersensibilidade é indicada por um rápido aumento dos níveis de IgE nos primeiros dias após o consumo de peixe contaminado (FDA, 2011; Mattiucci et al., 2014).

O Homem pode ser um hospedeiro acidental quando ingere peixe ou cefalópodes com larvas de *Anisakis* L3 viáveis. Esta é a forma larvar suscetível de causar infeção (Ramos, 2011). A presença de larvas vivas de *Anisakis* no Homem pode evoluir para quadros clínicos distintos, tais como infeção do tubo digestivo, resultante de uma anisaquiose gástrica ou intestinal ou então, ocasionalmente, infeção de outros órgãos (ectópica) e as formas alérgicas, quando estão presentes larvas de *A. simplex* (Audicana e Kennedy, 2008; DGAV, 2014).

A anisaquiose gástrica é o quadro clínico mais frequente quando se trata de parasitismo por *A. simplex*. A reação inflamatória é uma consequência da perfuração das larvas do parasita na mucosa da parede do tubo digestivo, que leva à formação de um granuloma eosinofílico e que se manifesta por dor abdominal, náuseas e vômitos nas 12 horas após a ingestão de peixe cru (Audicana et al., 2002; Falcão et al., 2008).

Mais de 90% dos casos de anisaquiose são causados por uma única larva, contudo estão descritos alguns casos de parasitismo massivo (Daschner et al., 1997). Alguns doentes apresentam sintomatologia abdominal acompanhada de reação alérgica de hipersensibilidade, mediada por IgE, com sintomas de urticária, angioedema ou anafilaxia. Esta síndrome designa-se anisaquiose gastro-alérgica (Daschner et al., 2000).

Não havendo tratamento farmacológico específico para destruir eficazmente os parasitas viáveis *in vivo*, a prevenção é a forma mais eficaz de intervenção. O parasita *A. simplex* é o único parasita associado aos produtos da pesca responsável por quadros clínicos de alergia, quer anisaquiose gastro-alérgica em que os sintomas alérgicos surgem numa situação de parasitismo gástrico agudo devido a infeção com a larva viva, quer alergia ao parasita *A. simplex* mediada por IgE, resultante da presença de alérgenos nos produtos da pesca, sem a necessária presença do parasita vivo (Audicana e Kennedy, 2008).

A principal via de sensibilização no homem é a digestiva, com infeção pela larva viva mas, também pode ocorrer sensibilização através do aparelho respiratório e contacto com a pele e mucosas, dando origem a diferentes formas clínicas de alergia ao parasita *A. simplex* como doença reumática, doença respiratória crónica e dermatite, conjuntivite, asma e urticária ocupacionais (Añibarro e Scoane, 1998; Armentia et al., 1998; Cuende et al., 1998; Scala et al., 2001; Nieuwenhuizen et al., 2006).

Terapia Fotodinâmica

Conceito

A terapia fotodinâmica resulta da interação da luz com um composto fotossensibilizador não tóxico (porfirina por exemplo) e o oxigénio que está presente nos tecidos dos organismos. Daqui resultam espécies reativas de oxigénio, tais como oxigénio singlete, peróxido de hidrogénio e hidróxido, que são capazes de inviabilizar as células, causando a morte dos microrganismos (Wainwright, 1998; Jori e Coppelotti, 2007; Tavares et al., 2010).

Quando um composto fotossensível absorve energia luminosa num determinado comprimento de onda, este transfere energia para a molécula de oxigénio, que passa a um estado mais energético podendo tornar-se citotóxica (Wainwright, 1998; Jori e Brown, 2004; Jori e Coppelotti, 2007; Lin, 2014).

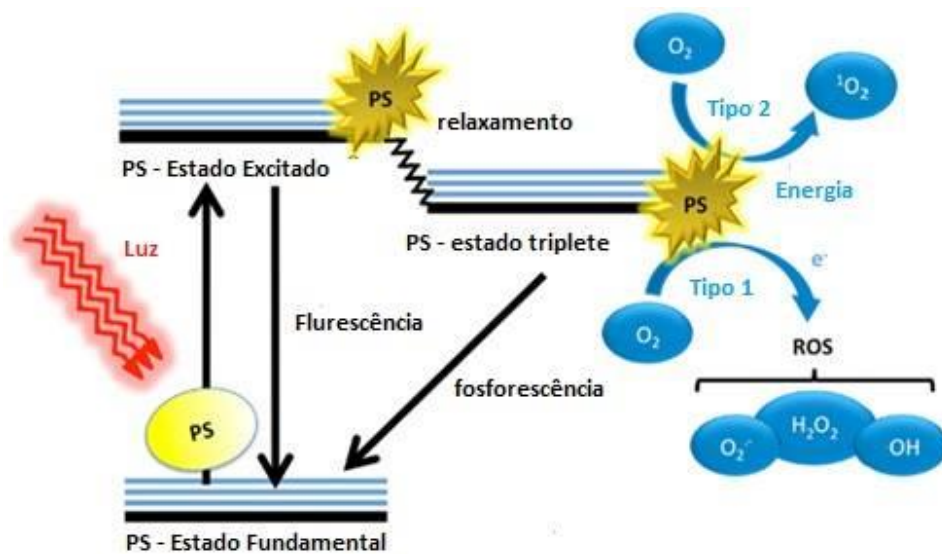


Figura 4 – Representação esquemática do mecanismo de terapia fotodinâmica (adaptado de Dai et al., 2012)

Esta terapia envolve três componentes principais:

- Um fotossensibilizador
- Uma fonte de luz
- Oxigénio do meio (Wang et al., 2002).

A combinação destes três componentes leva à destruição química de quaisquer tecidos com afinidade para o fotossensibilizador e expostos à luz (Wang et al., 2002) (figura 4). O comprimento de onda da fonte de luz deve ser adequado para excitar o fotossensibilizador e para produzir espécies reativas de oxigénio (Maisch, 2006; Jori e Brown, 2004; Pedigo et al., 2009).

Estas espécies reativas de oxigénio geradas através da terapia fotodinâmica são os radicais livres provocados por meio da remoção de um átomo ou transferência eletrónica de uma molécula de substrato e o estado altamente reativo de oxigénio conhecido como oxigénio atómico (Jori e Coppelotti, 2007; Alves et al., 2011; Taraszkiewicz et al., 2013).

Na compreensão deste mecanismo é importante distinguir a terapia fotodinâmica de outras terapias de luz usadas na cicatrização de feridas e em técnicas de rejuvenescimento, ou intensa depilação a luz pulsada, que não necessitam de um fotossensibilizador (Bonnett, 2000; Arrojado et al., 2011).

Estado de Arte

A fim de alcançar a destruição seletiva de uma área alvo através desta terapia e deixar intactos os tecidos normais, o fotossensibilizador pode ser aplicado localmente na área alvo ou os alvos fotossensíveis podem ser localmente expostos à luz. Por exemplo, no tratamento de doenças da pele, incluindo a acne, psoríase, e também os cancros da pele, o fotossensibilizador pode ser aplicada topicamente e excitado localmente por uma fonte de luz (Maisch, 2006; Tavares et al., 2010; Beirão et al., 2014).

No tratamento local dos tecidos internos e cancros, após a utilização dos fotossensibilizadores que podem ser administrados por via intravenosa, a luz pode ser incidida na área de alvo utilizando os endoscópios e cateteres de fibra ótica (Dougherty et al., 1978; Alves et al., 2011).

Os fotossensibilizadores podem ter como alvo muitas espécies microbianas e virais, incluindo o HIV (Maisch, 2006). A terapia fotodinâmica pode ser aplicada na descontaminação de amostras de sangue e de medula óssea antes de serem utilizadas (Boumedine e Roy, 2005; Huang, 2005).

A terapia fotodinâmica também pode erradicar uma ampla variedade de agentes patogénicos da pele e das cavidades orais (Moan e Peng, 2003; Jori e Coppelotti,

2007). Devido à resistência dos agentes patogénicos a fármacos, há cada vez mais trabalhos sobre este tratamento como uma nova terapia antimicrobiana (Bonnett, 2000; Garcez et al., 2013).

Porfirinas

As porfirinas são uma classe de moléculas orgânicas com uma estrutura geral de macrociclo tetrapirrólico ligados por ligações (-CH-), que possui no seu centro capacidade para a ligação de um ião metálico (O'Connor et al., 2009; Beirão et al., 2014) (figura 5).

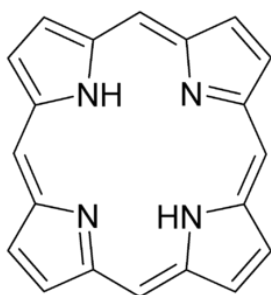


Figura 5 – Representação molecular da Porfirina (Fonte: bdigital.ufp.pt)

Este ião metálico liga-se a quatro átomos de azoto presentes no centro. Os representantes mais comuns desta classe de compostos são o grupo *heme* (que contém ferro), a clorofila (que contém magnésio) e os pigmentos biliares. Porfirinas de níquel e ou de vanádio são comuns na composição do petróleo, sobretudo nas frações mais pesadas (Whelan et al., 2001; Taraszkiewicz et al., 2012; Beirão et al., 2014).

As porfirinas podem ser de origem natural ou sintética (Almeida et al., 2009) e, geralmente, têm cor púrpura (Tuffy, B., 2011). A estrutura em anel da porfirina é a razão pela qual todos os derivados porfíricos absorvem luz a um comprimento de onda próximo dos 410 nm, dando-lhes a sua cor característica (Whelan et al., 2001; O'Connor et al., 2009).

A presença adicional de um ião metálico pode afetar esta propriedade devido ao fenómeno de transferência de carga dos átomos de azoto para o metal, que possui uma energia na gama da radiação visível (Jori et al., 2006; Beirão et al., 2014).

Os derivados metálicos da porfirina comportam-se frequentemente como compostos de coordenação, em que o ião metálico ligado aos átomos de azotos pode ter capacidade

de ligar mais um ou dois grupos químicos no eixo perpendicular ao plano do anel da porfirina (Whelan et al., 2001; Jori e Coppelotti, 2007; Arrojado et al., 2014).

Há porfirinas de origem natural onde, no macrociclo, há substituintes nas posições β -pirrólicas, e porfirinas sintéticas, onde os substituintes encontram-se nas posições meso do esqueleto porfirínico (Taraszkiewicz et al., 2012; Beirão et al., 2014).

O aparecimento de parasitoses é devido a uma combinação de fatores ambientais, e um dos principais fatores é o elevado número de peixes nos tanques ou em sistemas de recirculação. São conhecidas ectoparasitas de peixes de diferentes classes. São contabilizadas grandes perdas nos *stocks* de peixe devido à propagação de parasitas, como por exemplo a doença do ponto branco causada pelo parasita *Ichthyophthirius multifiliis* (Richter et al., 2014).

Foi investigado o efeito de substâncias com potencial para o uso da terapia fotodinâmica, como a clorofilina (derivados semi-sintéticos de clorofila), em parasitas de peixes. Provou-se que a aplicação da clorofilina tem efeitos antimicrobianos e é eficiente contra diferentes pequenos crustáceos e protozoários ciliados (Richter et al., 2014).

Existem estudos em que foram aplicadas baixas concentrações de clorofilina em águas com larvas de mosquito. Estas larvas foram mortas através da atividade fotodinâmica da clorofilina, na presença de luz. Após exposição à luz da clorofilina, há transferência da sua energia para a produção de oxigénio atómico e outras espécies reativas de oxigénio. Estas espécies reativas têm o potencial de danificar ou matar fases larvares dos organismos (Wohllebe et al., 2012).

Foi demonstrado que a aplicação de clorofilina em trofontes de *Ichthyophthirius multifiliis* é capaz de matar estes estádios de vida do parasita. Em baixas concentrações, a clorofilina já é capaz de reduzir o número de parasitas, como provam resultados *in vitro* (Wohllebe et al., 2012). A utilização destes derivados de clorofila têm a vantagem de serem de fácil obtenção e baixo custo de produção (Wohllebe et al., 2012).

Também foram realizados alguns estudos para avaliar o potencial da terapia fotodinâmica na inativação de protozoários em estágios tanto vegetativos como formas quísticas. Em particular, foi testada a fotossensibilização com culturas de *Acanthamoeba palestinensis*. Verificou-se que este parasita foi inativado com sucesso, pois os conteúdos celulares foram danificados. Este parasita é um protozoário que tem um ciclo de vida livre e amplamente distribuído em diversos ambientes (Ferro et al.,

2006). Mais tarde foram relatados resultados obtidos com o objetivo de identificar os alvos de processos no compartimento citosólico e no compartimento mitocondrial, conseguindo assim um importante avanço na compreensão dos principais mecanismos que controlam a morte celular (Ferro et al., 2009).

Foi realizado um outro estudo que se baseia na utilização de compostos de porfirina ativados pela luz solar para potenciar as medidas de controlo ambiental existentes e ainda controlo de insetos que são vetores de agentes patogénicos (Fabris et al., 2012). Os derivados de porfirina podem ser modificados para serem mais eficazes em sistemas biológicos. As associações transportador-porfirina devem ser estáveis com o objetivo de os organismos que não são o alvo, não serem danificados (Fabris et al., 2012).

Em aquacultura tem sido usada a terapia fotodinâmica antimicrobiana (antimicrobial photodynamic therapy - aPDT) em tratamentos. Recentemente, tem sido trabalhado uma série de modelagens teóricas sobre a foto-polimerização e processos de ligamentos cruzados (Jori e Brown, 2004; Arrojado et al., 2011).

A abordagem aPDT baseia-se no conceito de terapia fotodinâmica, em que um fotossensibilizador (PS) localizado preferencialmente em células alvo, quando cativado por baixas doses de luz visível com um comprimento de onda apropriado, gera espécies citotóxicas (espécies reativas de oxigénio, tal como o oxigénio singlete e radicais livres) que vão destruir ou danificar as moléculas biológicas por oxidação (Jori et al., 2006; Arrojado et al., 2011).

As doenças bacterianas e parasitárias são um grande problema na aquacultura em expansão. Existem dois grandes grupos de bactérias relevantes para a saúde pública, pois contaminam os produtos da aquacultura: as que naturalmente estão presentes no ambiente e as introduzidas através de contaminação ambiental (Pedigo et al., 2009; Arrojado et al., 2011).

Há uma preocupação crescente no que diz respeito à capacidade de resistência das bactérias patogénicas comuns e à dispersão de antibióticos no ambiente devido a tratamentos médicos. Atualmente, a terapia fotodinâmica antimicrobiana está a ter uma atenção considerável devido ao seu potencial como uma nova forma de tratamento, tendo-se provado que os microrganismos não desenvolvem resistência a esta terapia (Tavares et al., 2010; Arrojado et al., 2011).

Alguns autores utilizaram este método para inativar bactérias resistentes a medicamentos e concluíram que estas bactérias são tão suscetíveis como bactérias

não sujeitas a nenhum tratamento desta tecnologia. Isto quer dizer que o processo aPDT parece ser uma alternativa promissora para o tratamento e a erradicação de infecções microbianas (Bonnett, 2000; Arrojado et al., 2011).

Como a principal utilização de aPDT é na área clínica, estudos recentes têm demonstrado que para inativação microbiana em águas potáveis e de resíduos também é possível que a radiação solar possa ser usada como uma fonte de luz (Jori e Coppellotti, 2007; Arrojado et al., 2011).

Embora haja poucos estudos sobre a utilização desta terapia em sistemas de aquacultura, os resultados preliminares indicam que esta tecnologia tem um grande potencial para desinfetar águas da aquacultura (Maisch, 2006; Arrojado et al., 2011).

A aPDT pode ser considerada uma tecnologia alternativa para desinfetar águas da aquicultura, pois utilizando a luz solar é possível a inativação eficaz de microrganismos assim como desenvolvimento improvável de estirpes fotoresistentes e ainda a irradiação de águas piscícolas. No entanto, como os fotossensibilizadores não apresentam seletividade microbiana, podem inativar microrganismos não patogénicos que têm um papel ecológico importante em sistemas aquáticos, como em sistemas de aquacultura intensiva e semi-intensiva (Arrojado et al., 2011; Lin, 2014).

Estes microrganismos não patogénicos estão presentes nos filtros e têm um papel central no funcionamento e na produtividade dos sistemas aquáticos. Eles são os componentes biológicos mais importantes envolvidos na transformação e remineralização de matéria orgânica em sistemas aquáticos (Arrojado et al., 2011; Garcez et al., 2013).

Em águas costeiras, bactérias heterotróficas podem utilizar até 40% do carbono fixado pelos produtores primários e são particularmente qualificados para a transformação da matéria orgânica. Os produtores primários como bactérias são os principais intervenientes nos ciclos biogeoquímicos no ambiente aquático e representam uma boa escolha para avaliar o impacto da aPDT (Alves et al., 2011, Arrojado et al., 2011).

Apenas uma fração de bactérias no sistema aquático está ativa. A avaliação do impacto deste tratamento em aquacultura não deve ser feito através do número total de bactérias (ativas e inativas). A fração de bactérias cultiváveis e ativas (inclui a maior parte das bactérias patogénicas conhecidas que infetam os peixes) são um indicador apropriado para avaliar o impacto do processo aPDT nos sistemas de aquacultura (Almeida et al., 2009; Alves et al., 2011; Arrojado et al., 2011).

Os parasitas também são uma preocupação, porque muitas vezes podem causar lesões nos tecidos dos peixes, criando um local ideal para infecções causadas por bactérias que são importantes em aquacultura, como *Photobacterium damsela* subespécie *piscida*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* (World Health Organization, 1995; Almeida et al., 2009).

A criação de estirpes de microrganismos fotoresistentes a esta terapia é muito improvável, pois há o conhecimento do modo de ação das porfirinas e também há resultados obtidos com a utilização desta terapia sobre uma grande variedade de microrganismos, tais como bactérias gram-positivas e gram-negativas incluindo estirpes multirresistentes, esporos de bactérias, vírus, bacteriófagos, leveduras e ovos de helmintos. Isto sugere que este princípio pode ser aplicado em fotodescontaminação de pisciculturas, com a finalidade de destruir microrganismos patogénicos (Almeida et al., 2009).

Para implementar esta tecnologia em aquaculturas serão precisos mais estudos, nomeadamente em relação à determinação da estabilidade dos novos conjugados porfirina-híbridos em condições visíveis de luz de irradiação. Além disso, não existem estudos sobre o impacto que este procedimento pode ter sobre a estrutura da comunidade microbiana total após tratamento (Almeida et al., 2009).

O efeito fotodinâmico produz danos principalmente nas estruturas externas em bactérias e no ADN (Hamblin e Hassan, 2004). Os danos nas estruturas externas podem envolver perda do conteúdo celular ou inativação de sistemas de transporte de membrana e enzimas (Li et al., 1997; Mettath et al., 1999). Outros estudos também mostraram que a eficácia da aPDT depende da estirpe bacteriana (Szpakowsk et al., 2001).

Como aPDT não é uma terapia que seleciona os microrganismos patogénicos, a comunidade microbiana não patogénica de sistemas de aquacultura semi-intensivo também pode ser afetada. As bactérias não patogénicas têm um papel ecológico importante nos sistemas de aquacultura, o que implica uma avaliação cuidadosa dos impactos ambientais antes que esta terapia seja implementada nos sistemas de aquacultura (Arrojado et al., 2011).

Nas pescas e em aquacultura são conhecidas muitas doenças causadas por graves infecções nos peixes. Muitas vezes, os peixes tornam-se hospedeiros de ectoparasitas, pois a pele é fácil de penetrar e os parasitas encontram-se num ambiente em que não correm o risco de sofrer de desidratação (Richter et al., 2014).

Material e Métodos

Este projeto foi realizado em parceria com a Universidade de Aveiro. Numa primeira fase, a amostra de carapau (*Trachurus trachurus*), foi adquirida em locais de venda ao público e foi acondicionada à temperatura de refrigeração. A recolha de parasitas foi feita após a necrópsia do carapau (abertura da cavidade abdominal e exposição dos órgãos internos). Os parasitas viáveis recolhidos foram acondicionados em água salgada e mantidos à temperatura de refrigeração.

Posteriormente, os parasitas recolhidos foram transportados para as instalações da Universidade de Aveiro onde foi realizado o ensaio de terapia fotodinâmica. Após este ensaio os parasitas foram de novo transportados para o Laboratório de Parasitologia de Animais Aquáticos (IPMA) e realizado o ensaio histológico.

O 1º ensaio inclui três grupos de parasitas (A1, A2 e A3) ($n=36$), um controlo claro ($n=12$) e um controlo escuro ($n=12$), tendo sido utilizada uma solução de porfirina catiónica sintética com uma concentração de 5 μm e a incidência de luz branca de 4 mW/cm^2 .

O 2º ensaio inclui três grupos de parasitas (A1, A2 E A3) ($n=20$). Um controlo claro ($n=20$) e um controlo escuro ($n=20$) tendo sido utilizada uma solução de porfirina catiónica sintética com uma concentração de 50 μm e a incidência de luz branca de 14 mW/cm^2 .

O controlo dos parasitas (viabilidade e comportamento) durante o ensaio foi avaliado de 2 horas em 2 horas num total de 15 horas.

No final do ensaio, os parasitas foram fixados em formalina neutralizada com carbonato de cálcio (pH 7) diluída a 10% em água do mar filtrada. A solução de formalina foi preparada a partir de formaldeído a 35% Merck. Posteriormente fez-se o estudo morfológico (exame histológico). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) – Este trabalho foi realizado no âmbito desta tese.

Nestes ensaios fizeram-se dois controlos: o controlo claro e controlo escuro. O controlo claro consistiu num grupo de parasitas que foi exposto a condições de irradiação idênticas às que os grupos de ensaio foram sujeitos, na ausência de porfirina.

O controlo escuro correspondeu a um grupo de parasitas colocado numa solução de porfirina, sem exposição à luz.

Exame histopatológico

O exame histológico foi efetuado seguindo o protocolo usado na rotina do Laboratório de Patologia de Animais Aquáticos (IPMA)

No estudo histológico foram usados 5 parasitas de cada lote. Após a fixação retiram-se pequenas porções da seção média do parasita, para o processamento histopatológico. As peças foram colocadas em água destilada, para remover o excesso de formol, e desidratadas, tendo, para esse efeito, sido submetidas a banhos de álcool etílico p.a. (Merck®) de graduação crescente (70°; 80°; 95° e 100°), durante períodos de 2 horas com a exceção da passagem em álcool a 95°, onde permaneceram 24 horas. Após a desidratação das peças, o álcool foi substituído por xilol p.a. (Merck®) durante 1,5 a 2 horas. As peças foram incluídas em parafina.

Os blocos foram cortados num micrótomo Leitz Wetzlar® de carrediça, obtendo-se cortes de 3µm de espessura, recorrendo-se ao uso de Mollifex® (Gurr, Barral da BDH) para facilitar os cortes. Posteriormente, os tecidos foram colocados em lâminas previamente pinceladas com albumina e colocadas na estufa a 45°C. Após aproximadamente 18 horas, a desparafinação completou-se com duas passagens em xilol, com a duração de 15 minutos cada. Antes de se proceder à coloração, os cortes foram hidratados, fazendo-os passar por banhos de álcool a 90°, a 70° e água destilada.

Na coloração dos cortes usou-se hematoxilina e eosina (H&E), com a seguinte metodologia: Hematoxilina de Harris (Merck®) (4 minutos), imersão em água destilada, imersão em álcool clorídrico (1 ml de ácido clorídrico fumegante p.a., Merck®, em 99 ml de álcool a 70°) seguida da coloração em eosina Gelbich (Merck®) (2 minutos) e novo processo de desidratação (álcool a 95° e a 100°). Por fim, os cortes permaneceram 10 minutos em xilol. Após remover o excesso de xilol, a montagem das preparações histológicas foi efetuada usando uma gota de Entellan® (Merck®).

Na observação histopatológica, as imagens foram estudadas com recurso a um microscópio ótico (Olympus® BX50F). As imagens foram obtidas através da câmara fotográfica (Moticam 10 (10Mp)) associada ao microscópio ótico.

Resultados

As larvas de *Anisakis* não foram inativadas com menores concentrações de PS e menor irradiação de luz ($5 \mu\text{M}$, 4 mW/cm^2), contudo, quando sujeitas a concentrações mais elevadas e maior irradiação de luz ($50 \mu\text{M}$, 14 mW/cm^2) morreram.

Nas lâminas do controlo claro do 1º ensaio (figura 6) observou-se que havia uma ligeira separação na parede do intestino. Apesar desta ligeira separação não se verificou destruição da parede do intestino nem alargamento do lúmen intestinal ou lesões degenerativas. No controlo escuro não houve nenhuma alteração nos parasitas, as estruturas internas do parasita não apresentaram lesões degenerativas. (figura 7)

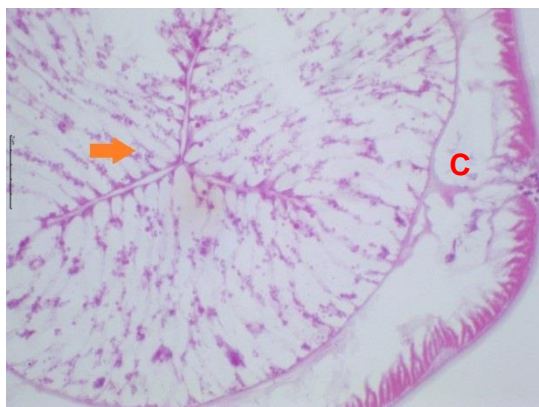


Figura 6 - Controlo Claro do 1º Ensaio (ampliação 40x) Barra de escala $5 \mu\text{m}$ (seta: lúmen do intestino, C: Cordões laterais)



Figura 7 - Controlo Escuro do 1º Ensaio (ampliação 40x) Barra de escala $5 \mu\text{m}$ (seta: lúmen do intestino, C: Cordões laterais)

Nos três grupos de ensaio (figuras 8, 9, 10, 11) verificou-se que não houve alterações causadas nos tecidos pela utilização desta terapia. Com a concentração usada neste ensaio não se observou separação da parede do intestino nem lesões degenerativas no lúmen. Os cordões laterais também se mantiveram intactos e sem lesões.

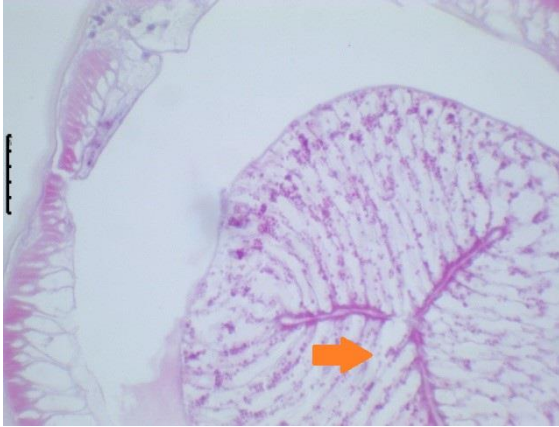


Figura 8 - Grupo A1 do 1º Ensaio (ampliação 40x) Barra de escala 5 μ m (seta: lúmen do intestino)



Figura 9 - Grupo A1 do 1º Ensaio (ampliação 40x) Barra de escala 5 μ m (seta: lúmen do intestino)



Figura 10 - Grupo A2 do 1º Ensaio (ampliação 40x) Barra de escala 5 μ m (seta: cordões laterais)

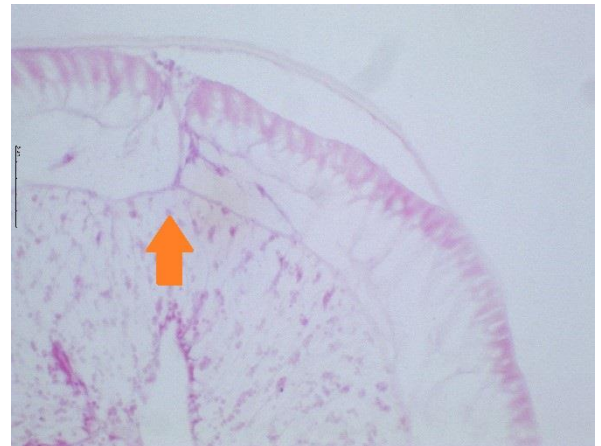


Figura 11 - Grupo A3 1º do Ensaio (ampliação 40x) Barra de escala 5 μ m (seta: cordões laterais)

No controlo claro e controlo escuro do 2º ensaio (figuras 12 e 13) não foram observadas lesões ou destruição na parede no intestino ou destruição dos cordões laterais.



Figura 12 - Controlo Claro do 2º Ensaio (ampliação 40x) Barra de escala 5 μ m (setas: lúmen do intestino e cordões laterais)

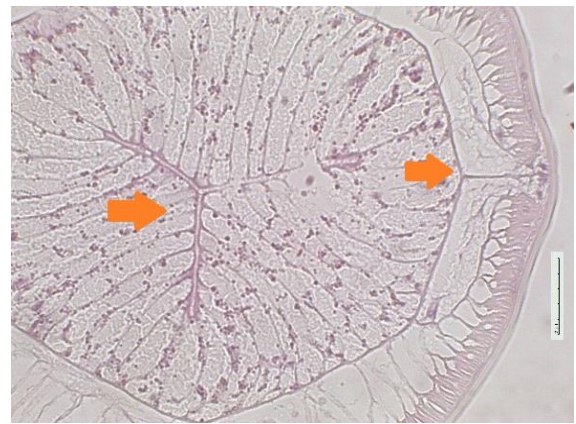


Figura 13 - Controlo Escuro do 2º Ensaio (ampliação 40x) Barra de escala 5 μ m (setas: lúmen do intestino e cordões laterais)

Nos três grupos do 2º ensaio verificou-se que houve destruição da parede do intestino, alargamento do lúmen intestinal e lesões degenerativas com presença de material celular, contudo não se verificou danos nos cordões laterais (Figuras 14, 15 e 16).

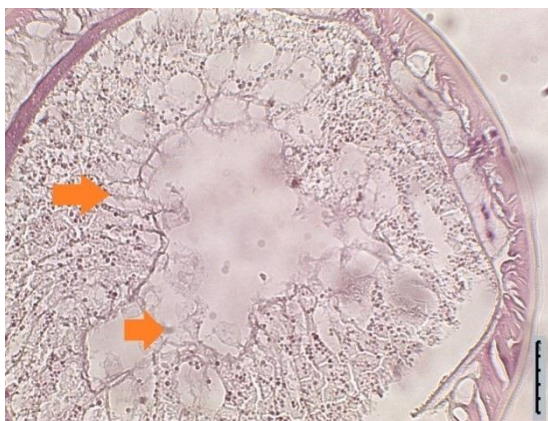


Figura 14 - Grupo A1 do 2º Ensaio (ampliação 40x) Barra de escala 5 μ m (setas: lúmen do intestino) Alargamento do lúmen intestinal e lesões degenerativas



Figura 15 - Grupo A2 2º do Ensaio (ampliação 40x) Barra de escala 5 μ m (setas: lúmen do intestino) Alargamento do lúmen intestinal e lesões degenerativas

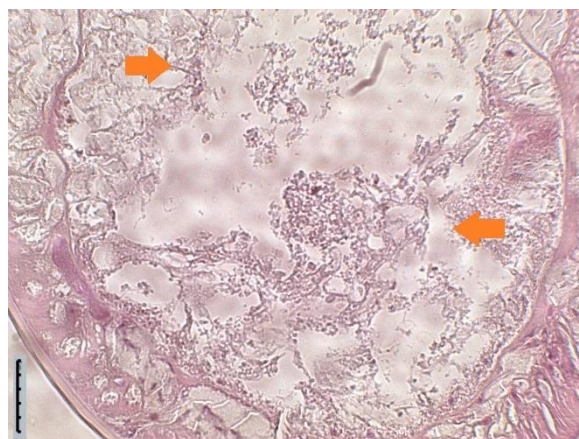


Figura 16 - Grupo A3 do 2º Ensaio (ampliação 40x) Barra de escala 5 μ m (setas: lúmen do intestino) Alargamento do lúmen intestinal e lesões degenerativas e presença de material celular

Discussão

Nos grupos controle, claro e escuro de ambos os ensaios não se observaram alterações na parede do intestino nem alargamento do lúmen intestinal, não se verificaram lesões degenerativas e também não ocorreu destruição dos cordões laterais.

No 2º ensaio em que se usou a concentração dez vezes superior à do 1º ensaio e intensidade luminosa de 14 mW/cm², os parasitas apresentaram alterações. Houve alargamento do lúmen intestinal e lesões degenerativas no intestino. Os cordões laterais também sofreram alterações, contudo não romperam nem a parede ficou destruída.

A rutura da parede intestinal pode ter resultado da possível entrada do composto via *per os* nas larvas L3, o que é reforçado pelas alterações histológicas intestinais. Em alguns exemplares observaram-se alterações da cutícula, nomeadamente irregularidades nos contornos que atribuímos ao processamento histológico dos tecidos.

Alguns estudos identificaram eficácia anti-helmíntica de substâncias extraídas de gengibre quando usado em larvas *Anisakis in vitro* (Goto et al., 1990). Os rizomas de gengibre têm sido usados como alimentos, bem como na medicina tradicional chinesa. Existem em 3 tipos: *Shokyo* (rizomas frescos), *Kanshokyo* (rizomas secos), ou *Kankyo* (secas, rizomas cozidos no vapor). Têm o propósito de serem eficazes como antiemético, expetorante, antitússica, entre outras utilizações (Goto et al., 1990). Vários componentes farmacologicamente ativos do gengibre foram evidenciados, por exemplo, óleo essencial (Goto et al., 1990), zingiberol (Goto et al., 1990), zingiberone (Eschenmoser e Schinz, 1950), zingibereno (Goto et al., 1990), e os componentes penetrantes, tais como [6]-gingerol (Akamatu, 1980) e [6]-shogaol (Connell e Sutherland, 1969).

No estudo em que foi testado o efeito larvívica de derivados de monoterpenos, como citral, carvacrol e citrenelol, em larvas L3 de *Anisakis* provou-se que os compostos utilizados têm a capacidade de provocar a morte das células da parede do intestino do parasita. Também foi evidenciado, no mesmo estudo, que a cutícula sofria alterações (Hierro et al., 2006). Este estudo mostrou que os compostos testados afetaram o intestino do parasita provocando a rutura da parede intestinal. Estes compostos causaram aumento do lúmen intestinal, com a presença de material celular. Também

se verificou que a cutícula do parasita foi alterada com deformações ou projeções em forma de espinhos (Hierro et al., 2006).

Ainda num outro estudo pôde-se concluir que o tratamento com derivados de monoterpenos, como α -pineno e *ocimeno* inibem de certa forma a capacidade de fixação e/ou de penetração das larvas L3 do parasita *A. simplex* s. l.. Contudo esta inibição é em grau menor, em comparação com outros monoterpenos (Navarro et al., 2008). Verificou-se, neste estudo, lesões na parede do intestino provocados por *ocimeno* e ainda lesões nos cordões laterais provocados por α -pineno e *ocimeno* (Navarro et al., 2008).

Segundo outro estudo, há dois mecanismos que podem ser propostos para a ação de *nerolidol*, *farnesol* e *elemol* em larvas L3 do parasita *Anisakis*: a inibição da biossíntese de compostos de isopreno que é indispensável para a glicosilação de proteínas em células eucarióticas; e um aumento na permeabilidade da membrana (Navarro-Moll et al., 2011). Estudos histológicos revelaram que o composto *nerolidol* provoca alterações da cutícula de nemátodos e uma rutura da parede intestinal do parasita (Navarro-Moll et al., 2011). Neste estudo verificou-se que *nerolidol* provocou alterações na cutícula dos nemátodos e rutura da parede intestinal do parasita, ao passo que o *farnesol* e *elemol* apenas danificaram a cutícula do parasita (Navarro-Moll et al., 2011).

Conclusão

Pretendeu-se estudar a eficácia da terapia fotodinâmica na inviabilização dos anisquídeos através do estudo das alterações morfológicas observadas nos parasitas.

Ao longo dos ensaios pudemos verificar que com a utilização de porfirinas no 1º ensaio em concentrações menores e com menor irradiação de luz (5 μM , 4 mW/cm^2) os parasitas não morreram nem sofreram alterações. No 2º ensaio com concentrações mais elevadas e maior irradiação de luz (50 μM , 14 mW/cm^2) verificaram-se alterações no intestino do parasita nomeadamente destruição dos tecidos e da parede, houve alterações na estrutura normal do intestino e os parasitas morrem

Contudo são necessários mais estudos para avaliar a aplicabilidade deste método no controlo da infeção por anisquídeos.

Bibliografia

- Abollo, E., D'Amelio, S. and Pascual, S., 2001, Fitness of the marine parasitic nematode *Anisakis simplex* s. str. in temperate waters of the NE Atlantic, *Diseases of Aquatic Organisms*, 45: 131-139.
- Adroher, F.J., Valero, A., Ruiz-Valero, J. and Iglesias, L., 1996, Larval anisakids (Nematode: Ascaridoidea) in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the fish market in Granada (Spain), *Parasitology Research*, 82: 253-256.
- Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X., Childs, C. J. H. and Sibata, C. H., 2004, Photosensitizers in clinical PDT, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (Elsevier), 1: 27-42.
- Almeida, A., Cunha, Â., Gomes, N. C.M., Alves, E., Costa, L. and Faustino, M. A. F., 2009, Phage Therapy and Photodynamic Therapy: Low Environmental Impact Approaches to Inactivate Microorganisms in Fish Farming Plants, *Mar. Drugs*, 7: 268-313.
- Alves, E., Faustino, M. A. F., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, Â., Gomes, N. C. M. and Almeida, A., 2011, Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy in Aquaculture: Photoinactivation Studies of *Vibriofischeri*, *PLoS ONE*, 6: 20970.
- Anderson, S., Anderson, H. L., Bashall, A., McPartflin, M. and Sanders, J. K. M., 2003, Assembly and Crystal Structure of a Photoactive Array of Five Porphyrins, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34(10): 1096-1099.
- Añibarro, B. and Seoane, F.J., 1998, Occupational conjunctivitis caused by sensitization to *Anisakis simplex*, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102: 331-332.
- Arias-Diaz, J., Zuloaga, J., Vara, E., Balibrea, J. and Balibrea, J. L., 2006, Efficacy of albendazole against *Anisakis simplex* in vitro, *Digestive and Liver Disease*, 38: 24-26.
- Armentia, A., Lombardero, M., Callejo, A., Martín Santos, J. M., Martín Gil, F. J., Veja, J., Arranz, M. L. and Martínez, C., 1998, Occupational asthma by *Anisakis simplex*, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102: 831-834.
- Arrojado, C., Pereira, C., Tomé, J. P. C., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, Â., Calado, R., Gomes, N. C. M. and Almeida, A., 2011, Applicability of photodynamic antimicrobial

chemotherapy as an alternative to inactivate fish pathogenic bacteria in aquaculture systems, The Royal Society of Chemistry and Owner Societies, 10: 1691–1700.

- ASABE, 2009, Aquaculture's growth continuing: improved management techniques can reduce environmental effects of the practice, Resource: Engineering & Technology for a Sustainable World, 16.5; 20-22.
- Atai, K. and Egusa, S., 1977, Studies on visceral mycosis of salmonids fry-II. Characteristics of fungi isolated from the abdominal cavity of amago salmon fry, Fish Pathology 11: 187-193.
- Audicana, M. T. and Kennedy, M. W., 2008, Anisakis simplex: from Obscure Infectious Worm to Inducer of Immune Hypersensitivity, Clinical microbiology Reviews, 21: 360–379.
- Audicana, M. T., Ansotegui, I. J., de Corres, L. F. and Kennedy M. W., 2002, Anisakis simplex: dangerous – dead and alive? Trends Parasitology, 18: 20-25.
- Balata, F., Devlin, S., Esteban, A. and Crilly, R., Fish dependence - 2014 update: the reliance of the EU in fish from elsewhere, New Economics Foundation, consultado a 22 de Março de 2015, <http://www.neweconomics.org/publications/entry/fish-dependence-2014-update>.
- Beirão, S., Fernandes, S., Coelho, J., Faustino, M. A. F., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Almeida A. and Cunha, A., 2014, Photodynamic Inactivation of Bacterial and Yeast Biofilms With a Cationic Porphyrin, Photochemistry and Photobiology, 90: 1387–1396.
- Berland, B., 2006, Musings on Nematode Parasites. Report for Institute of Marine Research, 11, Bergen, Norway: Biologisk institutt, University of Bergen, pp. 29-33.
- Bonnett, R., 2000, Chemical aspects of photodynamic therapy, Advanced Chemistry texts, Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam.
- Boumedine, R. S. and Roy, D. C., 2005, Elimination of alloreactive T cells using photodynamic therapy, Cytotherapy Journal, 7 (2): 134–143.
- Brutti, A., Rovere, P., Cavallero, S., D'Amelio, S., Danesi, P. and Arcangeli, G., 2010, Inactivation of *Anisakis simplex* larvae in raw fish using high hydrostatic pressure treatments, Food Control, 21: 331-333.
- Burton, T. O., Meyers, T. R., Starkey, N. S. and Follett, J. E., 2004, Experimental transmission of the fungus *phoma herbarum* to Chinook salmon. Journal of Aquatic Animal Health, 16: 251-257.

- Caballero, M. L., Moneo, I., Gómez-Aguado, F., Corcuera, M. T., Casado, I. and Rodríguez-Pérez, R., 2008, Isolation of *Anisakis* s5, an excretory–secretory and highly heat-resistant allergen useful for the diagnosis of *Anisakis* larvae sensitization, *Parasitology Research*, 103: 1231–1233.
- Carvalho-Varela, M., 2005, *Parasitas e Parasitoses em Piscicultura*. Lisboa, Portugal: Ordem dos Médicos Veterinários, pp. 487-497.
- Chen, B., Pogue, B. W., Hoopes, P. J. and Hasan, T., 2006, Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy, *Critical Reviews Eukaryotic Gene Expression*, 16 (4): 279–305.
- Connell, D. W. and Sutherland, M. D., 1969, A reexamination of gingerol, shogaol and zingerone, the pungent principles of ginger (*Zingiber officinale*), *Australian Journal of Chemistry*, 25:1033-1043.
- Connolly, M. A., 2005, *Communicable disease control in emergencies: a field manual*, Edited by M.A. Connolly, World Health Organization.
- Cuende, E., Audicana, M. T., Garcia, M., Anda, M., Fernandez Corres, L., Jimenez, C. and Vesga, J. C., 1998, Rheumatic manifestations in the course of anaphylaxis caused by *Anisakis simplex*, *Clinical Experimental Rheumatology*, 16: 303-304.
- Dai, T., Fuchs, B. B., Coleman, J. J., Prates, R. A., Astrakas, C., St. Denis, T. G., Ribeiro, M. S., Mylonakis, E., Hamblin, M. R. and Tegos, G. P., 2012, Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform, *Frontiers in Microbiology*, 3:120.
- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Cabañas, R., Suarez-deParga, M. L. and López-Serrano, M-C., 2000, Gastroallergic anisakiasis: Bordline between food allergy and parasitic disease-Clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*, *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 105: 176-181.
- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Mora, C., Moreno-Ancillo, R., Villanueva, R. and López-Serrano, M. C., 1997, Anisakiasis gastro-alérgica con parasitación masiva. *Spanish journal Allergy Clinical Immunology*, 12: 370-372.
- Del Rey Moreno, A., Valero, A., Mayorga, C., Gómez, B., Torres, M. J., Hernández, J., Ortiz, M. and Maldonado, J. L., 2006, Sensitization to *Anisakis simplex* s.l. in a healthy population, *Acta Tropica*, 97: 265-269.
- DGAV, 2015, *Segurança Alimentar: Parasitas nos produtos da pesca*, consultado 13 Abril de 2015, <http://www.dgv.min->

agricultura.pt/xeov21/attachfileu.jsp?look_parentBoui=9422480&att_display=n&att_download=y.

- DGS, 2015, Norma nº14/2012, Anafilaxia: Abordagem clínica, consultado a 13 de Abril de 2015, <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0142012-de-16122012-png.aspx>
- Dougherty, T. J., Kaufman J. E., Goldfarb, A., Weishaupt; K. R., Boyle, D. and Mittleman, A., 1978, Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors, *Cancer Research*, 38 (8): 2628–35.
- EMBRAPA, Empresa brasileira de pesquisa agropecuária, A aquacultura e a atividade pesqueira, Embrapa Meio Ambiente, consultado em 12 de Abril de 2015, <http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/index.php3?sec=aquic>
- Fabris, C., Soncin, M., Jori, G., Habluetzel, A., Lucantoni, L., Sawadogo, S., Guidolin, L. and Coppelotti, O., 2012, Effects of a new photoactivatable cationic porphyrin on ciliated protozoa and branchiopod crustaceans, potential components of freshwater ecosystems polluted by pathogenic agents and their vectors, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11: 294
- Falcão, H., Lunet, N., Neves, E., Iglésias, I. and Barros, H., 2008, *Anisakis simplex* as a risk factor for relapsing acute urticaria: a case–control study, *Journal of Epidemiology & Community Health*, 62: 634-637.
- FAO, 2009, Fish farming is the way forward.'(Big Picture)(Food and Agriculture Administration's 'State of Fisheries and Aquaculture' report). *The Ecologist*, 39(4): 8-9
- FAO, 2015, Nações Unidas, Comércio mundial de peixes bate recorde de 160 milhões de toneladas, consultado em 12 de Abril de 2015, <http://www.unmultimedia.org/radio/portuguese/2014/02/comercio-mundial-de-peixes-bate-recorde-de-160-milhoes-de-toneladas/#.VbJd1PIViko>.
- FAO, O peixe, fonte de alimentação, meio de subsistência e de comércio, 2014, FAO, consultado em 12 de Abril de 2015, www.fao.org/docrep/012/i0765pt/i0765pt09.pdf
- Ferro, S., Coppelotti, O., Roncucci, G., Ben Amor, T. and Jori, G., 2006, Photosensitized inactivation of *Acanthamoeba palestinensis* in the cystic stage, *Journal of Applied Microbiology*, 101: 206-212.
- Ferro, S., Guidolin, L., Tognon, G., Jori, G. and Coppelotti, O., 2009, Mechanisms involved in the photosensitized inactivation of *Acanthamoeba palestinensis* trophozoites, *Journal of Applied Microbiology*, 107: 1615–1623

- Foti, C., Nettis, E., Cassano, N., Mundo, I. and Vena, G., 2002, Acute Allergic Reactions to *Anisakis simplex* after Ingestion of Anchovies, *Acta Dermato-Venereologica*, 82: 121-123.
- Garcez, A. S., Nunez, S. C., Azambuja, N., Fregnani, E. R., Rodriguez, H. M.H., Hamblin, M. R., Suzuki, H. and Ribeiro, M. S., 2013, Effects of Photodynamic Therapy on Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Biofilms by Bioluminescence Imaging and Scanning Electron Microscopic Analysis, *Photomedicine and Laser Surgery*, 10: 1-7.
- Gieseke, C. M., Serfling, S. G. and Reimschuessel, R., 2006, Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* ss. *Aquaculture*, 253: 120-129.
- Goto, C., Kasuya, S., Koga, K., Ohtomo, H. and Kagei, N., 1990, Lethal efficacy of extract from *Zingiber officinale* (traditional Chinese medicine) or [6]-shogaol and [6]-gingerol in *Anisakis* larvae in vitro, *Parasitology Research*, 76: 653-656.
- Hamblin, M. R. and Hasan, T., 2004, Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?, *Photochemistry Photobiology Sciences*, 3 (5): 436–450.
- Hassan, M. A., Mohamed, A. E.M. and Osman, H. A. M., 2013, Some studies on *Anisakidae* larvae in some marine fish species, *Researcher* 5(12): 172-180.
- Hatai, K. and Hoshiai, G., 1992, Mass mortality in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) due to *Saprolegnia parasitica* Coker, *Journal of Wildlife Diseases*, 28(4): 532-536.
- Hauck, A. K. and May, E. B., 1977, Histopathologic Alterations Associated with *Anisakis* larvae in Pacific herring from Oregon, *Journal of Wildlife Diseases*, 13: 290-293.
- Henriques, I. S., Almeida, A., Cunha, A. and Correia, A., 2004, Molecular sequence analysis of prokaryotic diversity in the middle and outer sections of the Portuguese estuary Ria de Aveiro, *FEMS Microbiology Ecology*, 49: 269–279.
- Hierro, I., Valero, A. and Navarro, M. C., 2006, In vivo larvicidal activity of monoterpenic from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l., *Phytomedicine*, 13: 527-531
- Huang, Z., 2005, A review of progress in clinical photodynamic therapy, *Technology and Cancer Research Treatment*, 4 (3): 283–93.

- Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V. A., Kadri, S., Pottinger, T. G., Sandoe, P. and Turnbull, J. F., 2006, Current issues in fish welfare, *Journal of Fish Biology*, 68, 2: 332–372.
- Hurst, R. J., 1984, Identification and description of larval *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Anisakidae: Nematoda) from New Zealand waters. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 18: 177-186.
- Jhingran, V. G., 1987, Introduction to aquaculture, United Nations Development Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research, Based on lectures presented by V. G. Jhingran at ARAC for the Senior Aquaculturists course.
- Jori, G. and Brown, S. B., 2004, Photosensitized inactivation of microorganisms, *Photochemistry Photobiology Science*, 3: 403–405.
- Jori, G. and Coppelotti, O., 2007, Inactivation of pathogenic microorganisms by photodynamic techniques: mechanistic aspects and perspective applications, *Anti-Infective Agents Medicinal Chemistry*, 6: 119– 131.
- Jori, G., Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppelotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G. and Roncucci, G., 2006, Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications, *Lasers Surgery Medicine Journal*, 38: 468–481.
- Karl, H., Baumann, F., Ostermeyer, U., Kuhn, T. and Klimpel, S., 2011, *Anisakis simplex* (s.s.) larvae in wild Alaska salmon: no indication of post-mortem migration from viscera into flesh. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94: 201–209.
- Kerr, K., 2004, Zoonoses. Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans, *Journal of Clinical Pathology*, 57(10): 1118-1120.
- Knoff, M., de São Clemente, S. C., Pinto, R. M. and Gomes, D. C., 2001, Nematodes of Elasmobranch Fishes from the Southern Coast of Brazil, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 81-87.
- Køie, M., Berland, B. and Burt, M. D. B., 1995, Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae), *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52: 134-139.
- Larizza, A. and Vovlas, N., 1995, Morphological Observations on Third-Stage Larvae of *Anisakis simplex* A (Anisakidae: Nematoda) from Adriatic and Ionian Waters, *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 62: 260-264.

- Lehner, K., Raga, J. A. and Siebert, U., 2005, Macroparasites in stranded and bycaught harbor porpoises from German and Norwegian waters, *Diseases of Aquatic Organisms*, 64: 265-269.
- Li, H., Fedorova, O. S., Grachev, A. N., Trumble, W. R., Bohach, W. R. and Czuchajowski, L., 1997, A series of meso-tris(N-methyl-pyridiniumyl)-(4-alkylamidophenyl) porphyrins: Synthesis, interaction with DNA and antibacterial activity, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure Expression*, 1354: 252–260.
- Lin, J. T., 2014, Analysis on the Efficacy of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy in Aquaculture Systems, *International Journal of Latest Research in Science and Technology*, 3: 37-39.
- Maisch, T., 2006, Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future?, *Lasers Medical Sciences*, 22: 83–91.
- Mattiucci, S., Cipriani, P., Webb, S.C., Paoletti, M., Marcer, F., Bellisario, B., Gibson, D.I. and Nascetti, G., 2014, Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae), *Journal of Parasitology*, 100: 199-214.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Dailey, M., Webb, S.C., Barros, N.B., Cianchi, R. and Bullini, L., 2005, Evidence for a new species of *Anisakis Dujardin*, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae), *Systematic Parasitology*, 61: 157-171.
- Mettath, S., Munson, B. R. and Pandey, R. K., 1999, DNA interaction and photocleavage properties of porphyrins containing cationic substituents at the peripheral position, *Bioconjugate Chemistry*, 10: 94–102.
- Miller, L., and Hurley, K., 2009, *Infectious disease management in animal shelters*, Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Ltd., Publication.
- Moan, J. and Peng, Q., 2003, An outline of the hundred-year history of PDT, *Anticancer Research*, 23 (5A): 3591–600.
- Mohamed, F., Ehab, E., Scott, F., Silva, V. and Mendoza, L., 2007, Outbreaks of phaeohyphomycosis in the chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) caused by *Phoma herbarum*, *Mycopathologia*, 163: 41-48.
- Moneo, I., Caballero, M. L., González-Muñoz, M., Rodríguez-Mahillo, A. I., Rodríguez-Perez, R. and Silva, A., 2005, Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*, *Parasitological Research*, 96: 285-289.

- Moneo, I., Caballero, M. L., Rodríguez-Perez, R., Rodríguez-Mahillo, A. I. and González-Muñoz, M., 2007, Sensitization to the fish parasite *Anisakis simplex*: clinical and laboratory aspects, *Parasitological Research*, 101: 1051-1055.
- Moravec, F., 1994, *Parasitic Nematodes of Freshwater Fishes of Europe*, in coedition by Academia, Prague and Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Murata, R., Suzuki, J., Sadamasu, K. and Kai, A., 2011, Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese waters, *Parasitology International*, 60: 193-198.
- Neish, C. A., and Hughes, C. C., *Fungal disease of fishes. In Diseases of fishes*, F. Snieszko and H. R. Axelrod (eds.). T. F. H. Publication, Inc., Neptune, New Jersey, 1980.
- Nieuwenhuizen, N., Lopata, A. L., Jeebhay, M. F., Herbert, D. R., Robins, T. G. and Brombacher, F., 2006, Food allergy, dermatologic diseases, and anaphylaxis: Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117: 1098-1105.
- Noguera, P., Collins, C., Bruno, D., Pert, C., Turnbull, A., MacIntosh, A., Lester, K., Bricknell, I., Wallace, S. and Cook, P., 2009, Red vent syndrome in wild Atlantic salmon *Salmo salar* in Scotland is associated with *Anisakis simplex sensu stricto* (Nematoda: Anisakidae), *Diseases of Aquatic Organisms*, 87: 199-215.
- O'Connor, A. E., Gallagher, W. M. and Byrne, A. T., 2009, Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy, *Photochemistry and Photobiology*.
- Ogbonna, C. I. C. and Alabi, R. O., 1991, Studies on species of fungi associated with mycotic infections of fish in a Nigerian freshwater fish pond, *Hydrobiologia*, 220: 131-135.
- Oshima, T., 1972, *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent areas, *Progress of Medical Parasitology in Japan*, 4: 305-393.
- Pacios, E., Arias-Diaz, J., Zuloaga, J., Gonzalez-Armengol, J., Villarroel, P. and Balibrea, 2005, Albendazole for the Treatment of Anisakiasis Ileus, *Clinical Infectious Diseases*, 41: 1825-1826.
- Park, S., 2007, Delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, *Korean Journal of Gastroenterology*: 49 (5): 300–313.

- Pascual, S., González, Á. F., Arias, C. and Guerra, Á., 1995, Histopathology of larval *Anisakis simplex* B (nematode, anisakidae), parasites of short-finned squid in the S.E. North Atlantic, Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 15(5): 160-161.
- Pedigo, L. A., Gibbs, A. J., Scott, R. J. and Street, C. N., 2009, Absence of bacterial resistance following repeat exposure to photodynamic therapy, From Conference Volume 7380 Photodynamic Therapy: Back to the Future, David H. Kessel, Seattle, USA.
- Pereira, C., 2009, Use of bacteriophages on the inactivation of pathogenic bacteria in aquaculture system, Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro, 2009.
- Petrie, A., Wootten, R., Bruno, D., MacKenzie, K. and Bron, J., 2007, A Survey of *Anisakis* and *Pseudoterranova* in Scottish fisheries and the efficacy of current detection methods. Report of Food Standard Agency, FSAS Project S14008, Stirling, Scotland, UK. pp. 1-16.
- Quiazon, K. M. A., Yoshinaga, T., Ogawa, K. and Yukami, R., 2008, Morphological differences between larvae and in vitro-cultured adults of *Anisakis simplex* (sensu stricto) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae), Parasitology International, 57: 483-489.
- Quiazon, K. M. A., Yoshinaga, T., Santos, M. D. and Ogawa, K., 2009, Identification of Larval *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) in Northern Japan Using Morphological and Molecular Markers, Journal of Parasitology, 95:1227-1232.
- Quiazon, K. M. A., Yoshinaga, T., Santos, M. D. and Ogawa, K., 2009, Identification of Larval *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) in Northern Japan Using Morphological and Molecular Markers, Journal of Parasitology, 95:1227-1232.
- Ramos, P., 2011, *Anisakis* spp. em bacalhau, *sushi* e *sashimi*: risco de infeção parasitária e alergia, Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, 106: 87-97
- Regulamento (CE) nº 1276/2011, de 8 de Dezembro de 2011, Jornal Oficial da União Europeia L327/39, Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, Bruxelas.
- Romero, M. C., Valero, A., Navarro-Moll, M. C. and Martín-Sánchez, J., 2013, Experimental comparison of pathogenic potential of two sibling species *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* in Wistar rat, Tropical Medicine and International Health, 18: 979-984.

- Rothemund, P., 1936, A New Porphyrin Synthesis. The Synthesis of Porphin, Journal of American Chemistry Society, 58 (4): 625–627.
- Sanmartín Durán, M. L., Quinteiro, P. and Ubeira, F. M., 1989, Nematode parasites of commercially important fish in NW Spain, Diseases of aquatic Organisms, 7: 75-77.
- Scala, E., Giani, M., Pirrotta, L., Guerra, E. C., Cadoni, S., Girardelli, C. R., De Pita, O. and Puddu, P., 2001, Occupational generalised urticaria and allergic airborne asthma due to *Anisakis simplex*, European Journal of Dermatology, 11, 249-50.
- Setyobudi, E., Soeparno, and Helmiati, S., 2011, Infection of *Anisakis sp.* larvae in some marine fishes from the southern coast of Kulon Progo, Yogyakarta, Biodiversitas, 12: 34-37.
- Shrestha, S., Kisino, A., Watanabe, M., Itsukaichi, H., Hamasuna, K., Ohno, G. and Tsugu, A., 2014, Intestinal anisakiasis treated successfully with conservative therapy: Importance of clinical diagnosis, World Journal of Gastroenterology, 20: 598-602.
- Silva, M. E. R. and Eiras, J. C., 2003, Occurrence of *Anisakis sp.* in fishes off the Portuguese West coast and evaluation of its zoonotic potential, Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 23: 13-17.
- Silva, M. E. R., 2002, Estudo da parasitose de peixes de Portugal por *Anisakis sp.* (Nematoda Ascaridida): prevalência, intensidade, migração e potencial zoonótico, Dissertação de mestrado em Hidrobiologia, Porto, Portugal: Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.
- Spangler, C. W., Starkey, J. R., Rebane, A., Meng, F., Gong, A. and Drobizhev, M., 2006, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XV, From Conference Volume 6427, David Kessel, San Jose, USA.
- Szpakowska, M., Lasocki, K. and Grzybowski, J., 2001, Photodynamic activity of the haematoporphyrin derivative with rutin and arginine substituents (HpD-Rut (2)-Arg(2)) against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, Pharmacological Research, 44: 243–246.
- Tang, H. M., Hamblin, M. R. and Yow, C. M., 2007, A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens, Journal of Infection and Chemotherapy, 13 (2): 87–91.

- Taraszkiewicz, A., Fila, G., Grinholc, M. and Nakonieczna, J., 2012, Innovative Strategies to Overcome Biofilm Resistance, BioMedical Research International 2013.
- Tavares, A., Carvalho, C. M. B., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, J. P. C. A. C., Tomé, Cavaleiro, J. A. S., Cunha, Â., Gomes, N. C. M., Alves, E. and Almeida, A., 2010, Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment, Marine Drugs Journal, 8: 91–105.
- Thacker, P., 2008, Fish Farms Harm Local Food Supply, Environmental Science and Technology, 40, 11:3445–3446.
- Tuffy, B., 2011, *Porphyrin Materials for Organic Light Emitting Diodes: A Route to Phosphorescent Emission*, Lambert Academy Publishing, Dublin, Irlanda.
- Ventura, M. T., Tummolo, R. A., Leo, E., D' Erasmo, M. e Arsieni, A., 2008, Immediate and Cell-Mediated Reactions in Parasitic Infections by *Anisakis simplex*, Journal of Investigational and Allergology Clinical Immunology, 18: 253-259.
- Vidaček, S., de las Heras, C., Solas, M. T., Mendizábal, A., Rodriguez-Mahillo, A. I., González-Muñoz, M. and Tejada, M., 2009, *Anisakis simplex* allergens remain active after conventional or microwave heating and pepsin treatments of chilled and frozen L3 larvae, Journal of the Science of Food and Agriculture, 89: 1997-2002.
- Wainwright, M., 1998, Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), J. Antimicrobial Chemotherapy, 42: 13–28.
- Wang, S. S., Chen, J., Keltner, L., Christophersen, J., Zheng, F., Krouse, M. and Singhal, A., 2002, New technology for deep light distribution in tissue for phototherapy, Cancer Journal 8 (2): 154–63.
- Whelan, H. T., Buchmann, E. V., Whelan, N. T., Turner, S. G., Cevenini, V., Stinson, H., Ignatius, R., Martin, T., Cwiklinski, J., Meyer, G. A., Hodgson, B., Gould, L., Kane, M., Chen, G. and Caviness, J., 2001, Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer, Space Technology and Applications International Forum, 552: 35–45.
- Willoughby, L. G., Roberts, R. J. and Chinabut, S., 1995, *Aphanomyces invaderis* sp. nov., the fungal pathogen of freshwater tropical fish affected by epizootic ulcerative syndrome. Journal of Fish Disease, 18: 273-276.
- Wohllebe, S., Richter, P. and Hader, D.-P., 2012, Chlorophyllin for the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet), Parasitology Research, 111: 729-733

- Yankova, M. H., Raykov, V. S. and Frateva, P. B., 2008, Diet Composition of Horse Mackerel, *Trachurus mediterraneus ponticus* Aleev, 1956 (Osteichthyes: Carangidae) in the Bulgarian Black Sea Waters, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 8: 321-327.

***Ligula intestinalis*: Rastreio do Céstodo na Albufeira da Barragem de Castelo de Bode. Identificação e Diagnóstico Diferencial**

Resumo

Em 2014, na albufeira da barragem de Castelo de Bode ocorreu uma mortalidade massiva de alburnos, *Alburnus alburnus* causada por larvas do parasita *Ligula intestinalis*. O parasita *Ligula intestinalis* é um céstodo que infecta peixes que vivem em reservatórios de água, sendo particularmente abundante em lagos e albufeiras. Na barragem onde ocorreu a mortalidade de peixe, há diversas atividades lúdicas, como a pesca recreativa onde há captura, para consumo próprio, de alburnos. Este estudo torna-se muito importante para a saúde pública devido à relevância desta barragem. Pretendeu-se fazer o rastreio do parasita *L. intestinalis* na albufeira de Castelo de Bode na sequência da epizootia registada em 2014, determinar os parâmetros da infeção parasitária, fazer o estudo histopatológico deste céstodo parasita e realizar um diagnóstico diferencial com o céstodo zoonótico *Diphyllbothrium latum*. Na primeira saída de campo observou-se a presença de medusas de água doce, *Craspedacusta sowerbii* na água da albufeira. Estas medusas têm células urticantes, o que poderá explicar a ausência de peixes na captura. Na segunda saída de campo, foram capturados alburnos que, após efetuada a necrópsia, se verificou não estarem infetados com *Ligula intestinalis*.

No estudo histológico efetuado nas larvas foram observadas características morfológicas, nomeadamente a ausência de segmentação do corpo, a existência de uma única série de complexos genitais, ao longo do estróbilo representando primórdio genital, os folículos vitelinos entre os músculos longitudinais e várias camadas de fibras musculares longitudinais sub-cuticulares. As características morfológicas observadas, o facto de a parasitose ter ocorrido em ciprinídeos e as larvas se encontrarem na cavidade abdominal, permitiu identificar os exemplares estudados como formas imaturas, larvas plerocercóide de *Ligula intestinalis*.

Abstract

A bleak, *Alburnus alburnus* mortality occurred in Castelo de Bode dam, located at the center of Portugal on July 2015. The cause was attributed to the plerocercoid *Ligula intestinalis* (Linnaeus, 1758) infection. This parasite is a cestode that infects fish in water reservoirs and are particularly abundant in lakes and reservoirs. In the dam, several recreational activities occurred, such as sport fishing with capture of bleak local consumption. This study becomes very important to public health because of the relevance of this dam. It was intended to make the parasite screening in the Castelo de Bode reservoir following the outbreak registered in 2014, determine the infection parameters, make the histopathology of this cestode parasite and establish a differential diagnosis with the zoonotic cestode *Diphyllbothrium latum*. In the first sample, it was observed the presence of freshwater jellyfish, *Craspedacusta sowerbii* in the reservoir water. These jellyfish have stinging cells, which may explain the lack of fish in the catch. In the second sample of bleak plerocercoid larvae were not found.

The morphological features observed in the histological sections were the unsegmented body, a single series of genital complex along the strobila representing the *genital primordia*, vitellogenic follicles between the longitudinal muscle and several layers of sub-cuticular longitudinal fibers. The morphological features of the studied specimens and their occurrence in the abdominal cavity of the cyprinid fish allowed their identification as a plerocercoid of *Ligula intestinalis*.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi o rastreio do parasita *L. intestinalis* na albufeira da barragem de Castelo de Bode na sequência da epizootia registada em 2014, determinar os parâmetros da infeção parasitária; o estudo histopatológico do parasita e o diagnóstico diferencial com o céstodo zoonótico *Diphyllbothrium latum*.

Introdução

O setor das pescas e aquacultura está em pleno desenvolvimento, pois é necessário aumentar a produção de proteína, devido à escassez dos recursos naturais e também pela necessidade de diversificar as fontes de proteína na alimentação do Homem. Por estas razões, o desenvolvimento deste setor é maior em relação a outros setores da economia e com isso acarreta alguns problemas, sobretudo no que diz respeito à transmissão de doenças para o Homem (FAO, 2014(a); FAO, 2014(d); New Economics Foundation, 2014).

O conhecimento das doenças que afetam os peixes selvagens e peixes provenientes de aquacultura e seus agentes etiológicos, assim como os seus ciclos biológicos são fundamentais para a preservação dos recursos naturais e também para o desenvolvimento da aquacultura (FAO, 2014(a); FAO, 2014(d); New Economics Foundation, 2014).

O estudo do céstodo *Ligula intestinalis* é importante do ponto de vista ambiental, pois um dos seus possíveis hospedeiros intermediários, o peixe alburno ou ablete, *Alburnus alburnus* é utilizado com fonte de alimento de outras espécies introduzidas nos sistemas estuarinos como o achigã, usadas na pesca desportiva e que por sua vez são predados por aves piscívoras, hospedeiros definitivos destes céstodos, disseminando os ovos do parasita e propagando o seu ciclo biológico (Harris e Wheeler, 1974; Eiras, 1994).

O parasita *L. intestinalis* é particularmente abundante em lagos e albufeiras, onde existem condições ótimas para o desenvolvimento dos seus hospedeiros intermediários e definitivos (Harris e Wheeler, 1974). Este parasita foi identificado em alburnos nas Ilhas Britânicas (Harris e Wheeler, 1974; Sweeting, 1976; Carvalho-Varela, 2005). Em Portugal a presença de larvas plerocercóides de *L. intestinalis* foram identificadas em alburnos na albufeira da barragem de Castelo de Bode (Ramos et al., 2014) e na albufeira das barragens de Montargil e Maranhão (Ramos, P., comunicação pessoal).

Descrição do local

A barragem de Castelo do Bode faz parte do conjunto de barragens da bacia hidrográfica alimentadas pelo curso do rio Zêzere. É uma das mais importantes e mais altas barragens de Portugal, situa-se no distrito de Santarém, e sua albufeira tem uma extensão de cerca de 60 km (APA, 2002). A barragem de Castelo de Bode é utilizada

para abastecimento de água a cerca de três milhões de pessoas em Lisboa para aproximadamente três milhões de pessoas, para produção de energia elétrica, para rega, como zona balnear e atividades recreativas e ainda, tem um papel importante na proteção em situações de cheias (APA, 2002).

Relato da parasitose

Na albufeira da barragem de Castelo de Bode ocorreu uma elevada mortalidade de alburnos no verão de 2014. Foram identificadas larvas plerocercóides do céstodo *L. intestinalis* como causa da morte dos peixes.

Na barragem onde ocorreu a mortalidade de peixe, decorrem diversas atividades lúdicas, como a pesca recreativa onde há captura, para consumo próprio, de alburnos. Este estudo torna-se muito importante para a saúde pública devido à relevância desta barragem.

A ocorrência de peixes mortos nas águas da albufeira da barragem de Castelo de Bode, o aparecimento de parasitas e ainda a atenção desmedida dos órgãos de comunicação e o seu impacto na vida socioeconómica local, levou a que este estudo fosse importante para o conhecimento do parasita, prevenção e controlo da parasitose (Ramos et al., 2014).

Caracterização da espécie

Alburnus alburnus

O alburno ou ablete (figura 17) é um peixe pequeno que pode medir até 25 cm de comprimento. O seu corpo é alongado e plano. A cabeça é pontiaguda e a boca levemente superior, a linha lateral é completa, possui barbatana anal longa, com 18 a 23 raios, as suas escamas são prateadas, tornando-se azuladas na região dorsal (Fishbase, 2015). Como os demais representantes da ordem Cypriniformes, o alburno possui o chamado aparelho *weberiano*, uma cadeia de ossos minúsculos que liga a bexiga natatória ao ouvido interno. Esse órgão sensível serve de alerta para qualquer movimento nas proximidades (Fishbase, 2015).



Figura 17 - *Alburnus alburnus* (fotografia original)

O alburno surge na Europa e na Ásia Ocidental - norte do Cáucaso, Pirenéus e Alpes, e para o leste em direção à bacia do Volga e do noroeste da Turquia. Ele está ausente nas grandes penínsulas do sul e nas ilhas britânicas, exceto sudeste de Inglaterra. No entanto, é introduzida a nível local como em Espanha, Portugal e Itália (Vinyoles et al., 2007).

Os alburnos podem ser encontrados nos rios e em lagos. Durante o crescimento alimentam-se de pequenos moluscos, insetos que caem na água, larvas de insetos, vermes, pequenos crustáceos e detritos vegetais. Os alburnos preferem águas abertas e podem ser encontrados em grandes números onde haja abundância de alimento (Fishbase, 2015).

A desova dos alburnos é feita perto da costa e em águas rasas, por vezes é em águas profundas. Reproduz-se com surpreendente rapidez: a fêmea pode depositar até 600.000 ovos no leito de cascalho das águas rasas (Fishbase, 2015).

Os alburnos são uma importante fonte de alimento para os peixes predadores. É mais sensível à poluição do que outros ciprinídeos, o que pode explicar o seu declínio na Europa norte-occidental. Muitas vezes, os alburnos são usados como isca para a pesca desportiva (Vinyoles et al., 2007; Ramos et al., 2014).

O céstodo, *Ligula intestinalis*

O parasita *Ligula intestinalis* é um céstodo que infecta peixes que vivem em reservatórios de água, particularmente abundante em lagos e albufeiras. Este parasita infecta diversas espécies de peixes de água doce, na sua maioria ciprinídeos e pode ser uma grande ameaça para as populações de peixes (Weekes e Penlington, 1986; Eiras, 1994; Innal et al., 2007; Bouzid et al., 2008).

Os parasitas adultos podem ter de 10 até 100 centímetros de comprimento e até 1,2 centímetros de largura (Weekes e Penlington, 1986; Barber et al., 2000; Brown et al., 2002). O parasita preenche todo o espaço disponível dentro da cavidade abdominal (Bean e Winfield, 1989; Stefka et al., 2009). O peso do parasita pode, em muitas ocasiões, exceder o peso total do corpo do peixe (Barber et al., 2000; Tizie et al., 2014).

O 1º hospedeiro intermediário é um crustáceo copépodo (figura 18). O peixe é o 2º hospedeiro intermediário deste parasita e o ciclo completa-se nas aves, nomeadamente garças, que se infetam ao alimentarem-se de peixes parasitados (Garcia-Berthou et al., 2007; Korkmaz e Zencir, 2009). As aves são os hospedeiros definitivos (Barber et al., 2000; Ergonul e Altindag, 2005). O peixe infeta-se através da ingestão de copépodes infetados e uma vez dentro do peixe, o parasita continua o seu ciclo de vida e passa a uma fase larvar de plerocercóide no corpo da cavidade do peixe. As larvas plerocercóides são infetantes para as aves piscívoras. A permanência do parasita no intestino das aves (onde evoluem para adultos) tem a duração de cerca de 5 dias, durante os quais produzem grande quantidade de ovos que são eliminados para o exterior juntamente com as fezes das aves (Ergonul e Altindag, 2005; Tizie et al., 2014). Uma vez no meio aquático os ovos eclodem e servem de alimento a uma

grande variedade de organismos do zooplâncton. O ciclo continua quando o peixe ingere o zooplâncton (Barber et al., 2000; Innal et al., 2010).

Os peixes de água doce são infectados quando ingerem as larvas procercóides presentes em crustáceos planctônicos e no zooplâncton, estes são os primeiros hospedeiros intermediários, que lhes servem de alimento (Stefka et al., 2009; Innal et al., 2010). Na cavidade abdominal dos peixes, que são os segundos hospedeiros intermediários, as larvas rapidamente evoluem desde larvas microscópicas procercóides para larvas de grandes dimensões, larvas plerocercóides (Loot et al., 2001; Innal et al., 2010; Bouzid et al., 2013).

O ciclo completa-se quando os pássaros ingerem o peixe parasitado (Loot et al., 2001; Brown et al., 2002; Innal et al., 2010).

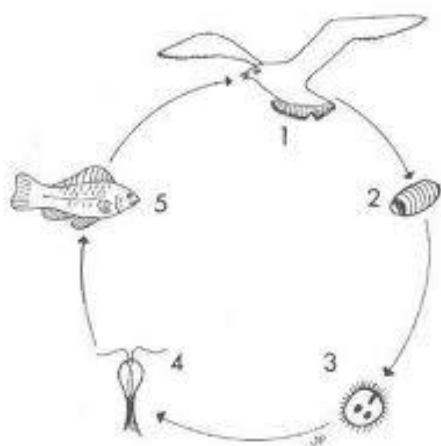


Figura 18 - Ciclo de vida do parasita *Ligula Intestinalis*. Legenda: 1 – Aves piscívoras (HD) infectada com parasita adulto. 2 – Ovo. 3 – Coracídio. 4 – Larva procercóide. 5 – Peixe (HI) parasitado com larvas plerocercóides. (Fonte: fisheriesmanagement.co.uk)

O peixe infectado pode apresentar uma clara distensão da parede do corpo consoante o aumento de tamanho do parasita ou da carga parasitária. Esta distensão pode causar deficiência no desenvolvimento muscular e redução da capacidade de natação o que faz com que aumente o risco de predação (Shields et al., 1976; Chubb et al., 1987; Hoole e Arme, 1988; Koyun, 2006).

Também pode haver alteração de diversos parâmetros sanguíneos (Arme e Owen, 1968; Brown et al., 2002), diminuição do crescimento, anemia, escurecimento do corpo e natação errática (Arme e Owen, 1968; Loot et al., 2001; Brown et al., 2002).

As aves infetadas têm um papel importante na dispersão dos ovos do parasita através das suas fezes, tornando difícil o controlo da infeção em populações selvagens (Arme e Owen, 1968; Mahbobeh, 2008). Se as condições forem favoráveis, a população de parasitas aumenta rapidamente e a sua ação patogénica pode causar a morte dos peixes hospedeiros. O céstodo parasita *Ligula* apresenta ciclos epizooticos por período superiores a 4 - 5 anos (Conradt e Schimdt, 1992; Mahbobeh, 2008).

Este parasita explora o hospedeiro, ou seja, adota uma estratégia diferente dependendo do sexo do seu hospedeiro (Arme e Owen, 1970; Harris e Wheeler, 1978; Loot et al., 2001). Quando o céstodo *L. intestinalis* infecta uma fêmea, o parasita desvia os recursos de tecido reprodutivo e quando infecta um macho, o parasita tenta obter alimento através das reservas de gordura. (Loot et al., 2001; Carter et al., 2005; Mahbobeh, 2008). Em estudos anteriores observou-se inibição da capacidade reprodutiva em peixes infetados com *L. intestinalis* (Loot et al., 2001; Carter et al., 2005; Mahbobeh, 2008).

O céstodo, *Diphyllbothrium* spp.

Parasitas do género *Diphyllbothrium* são céstodos que podem causar difilobotríase em seres humanos (figura 19) através do consumo de peixe cru ou mal cozinhado. É um céstodo que, assim como o parasita *Ligula intestinalis*, pode infetar peixes embora a exatidão dos registos para algumas das espécies não-humanas é contestada (Janovy e Roberts, 2005; Ahmadiara et al., 2013).

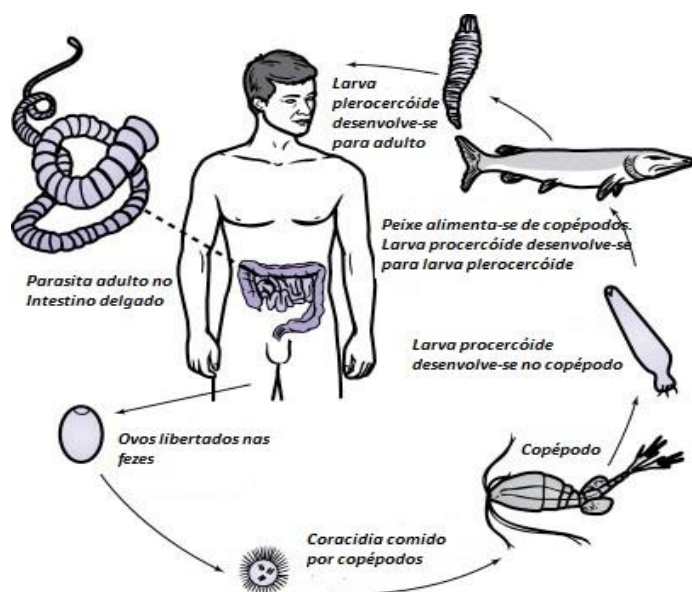


Figura 19 - Ciclo de vida do parasita *Diphyllobotrium latum*. (adaptado: medicine.academic.ru)

O parasita adulto é composto por três segmentos distintos morfologicamente (Andersen e Gibson, 1989):

- Escólex (cabeça)
- Pescoço
- Proglótis

Cada lado do escólex tem uma abertura, que é uma botria para fixação ao intestino do hospedeiro. O escólex está junto ao pescoço ou junto à região proliferativa. Do pescoço crescem os proglótides que contêm os órgãos reprodutivos do parasita (Chubb et al., 1987; Ahmadiara et al., 2013).

O céstodo, *Diphyllobotrium latum* é a ténia mais longa que parasita o Homem, atingindo em média dez metros de comprimento (Chubb et al., 1987; Andersen e Gibson, 1989). Os parasitas adultos podem colocar até um milhão de ovos por dia. Em adultos, as proglótides são maiores em comprimento do que em largura. Como em todos os céstodos, os poros genitais podem abrir medioventralmente (Andersen e Gibson, 1989).

Os ovos imaturos são eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo (os humanos são o principal hospedeiro final) onde os parasitas se reproduzem (Chubb et al., 1987; Ko, 2008). Após a ingestão por um crustáceo ou copépodo de água doce adequado, o primeiro hospedeiro intermediário, os coracidia desenvolvem-se em larvas procercóides (Andersen e Gibson, 1989; Ahmadiara, 2013).

Após a ingestão do copépodo por um segundo hospedeiro intermediário, tipicamente um peixe de pequenas dimensões, as larvas procercóides são libertadas do crustáceo e migram para músculo do peixe onde se desenvolvem em larvas plerocercóides (Chubb et al., 1987; Ko, 2008). As larvas plerocercóides são a fase infetante para o hospedeiro definitivo (incluindo seres humanos) (Andersen et al., 1987; Andersen e Gibson, 1989).

Quando os peixes pequenos infetados são consumidos por espécies predadoras maiores, como por exemplo, trutas, percas ou outros peixes (Andersen, 1987; Chubb et al., 1987), possibilitam a migração das larvas para a musculatura destes. Assim, quando o homem consome o peixe infetado mal cozinhado ou cru pode também ser infetado (deVos e Dick, 1989; Janovy e Roberts, 2005).

Após a ingestão de peixe contaminado, por um carnívoro, as larvas plerocercóides desenvolvem-se em adultos imaturos e, em seguida, em ténias adultas maduras que residem no intestino delgado (deVos e Dick, 1989; Ahmadiara et al., 2013). Os adultos fixam-se à mucosa intestinal, por meio das botrias do seu escólex (Chubb et al., 1987; deVos e Dick, 1990).

Os adultos em algumas espécies, como *D. latum*, podem ter mais de 3.000 proglótides (Chubb et al., 1987; Fukumoto et al., 1987). Um ou vários proglótis podem separar-se a partir do corpo principal da ténia e libertar ovos imaturos na água para iniciar novamente o ciclo biológico (Andersen e Gibson, 1989; deVos e Dick, 1989).

Os ovos imaturos são libertados a partir dos proglótides, até 1.000.000 ovos por dia, e são eliminados nas fezes (Fukumoto et al., 1987; Ahmadiara et al., 2013). O período de incubação em humanos, após os ovos começarem a aparecer nas fezes é de 4 a 6 semanas, mas pode variar de 2 semanas a 2 anos. A ténia pode viver até 20 anos no intestino humano (deVos et al., 1990; Janovy e Roberts, 2005).

Materiais e Métodos

O estudo da infeção parasitária por céstodos em alburnos, *Alburnus alburnus* da Albufeira de Castelo de Bode consistiu em:

1) Estudo epidemiológico da infeção parasitária. Obtiveram-se duas amostras:

A primeira amostra foi obtida no Inverno (Novembro) e a segunda foi obtida na Primavera (Maio).

O peixe capturado na barragem foi acondicionado e transportado para o Laboratório de Patologia de Animais Aquáticos, IPMA. Procedeu-se à medição, pesagem e necrópsia do peixe (abertura da cavidade abdominal e exposição dos órgãos internos), para recolha e preservação dos parasitas.

2) Estudo morfológico do parasita:

Este estudo foi efetuado em larvas plerocercóides recolhidas de alburnos. Estas larvas foram retiradas de alburnos no seguimento da epizootia de 2014 e estavam preservados em formalina neutralizada com carbonato de cálcio (pH 7) diluída a 10% em água do mar filtrada. A solução de formalina foi preparada a partir de formaldeído a 35% Merck. Posteriormente fez-se o estudo morfológico (exame histológico). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E).

No exame histológico usaram-se 5 indivíduos para estudo das características morfológicas e sua identificação. De cada larva foram retiradas as extremidades e 3 porções do parasita.

Exame histopatológico

Das larvas fixadas retiram-se pequenas porções do corpo (extremidades anterior e posterior e ainda 3 secções diferentes do corpo) para o processamento histológico. As peças foram colocadas em água destilada, para remover o excesso de formol, e desidratadas, tendo, para esse efeito, sido submetidas a banhos de álcool etílico p.a, (Merck®) de graduação crescente (70º; 80º; 95º e 100º), durante períodos de 2 horas com a exceção da passagem em álcool a 95º, onde permaneceram 24h. Após a desidratação das peças, o álcool foi substituído por xilol p.a. (Merck®) durante 1,5 a 2 horas. As peças foram incluídas em parafina.

Os blocos foram cortados num micrótomo Leitz Wetzlar® de carrediça, obtendo-se cortes de 3µm de espessura, recorrendo-se ao uso de Mollifex® (Gurr, Barral da BDH) para facilitar os cortes. Posteriormente, os tecidos foram colocados em lâminas previamente pinceladas com albumina e colocadas na estufa a 45°C. Após aproximadamente 18 horas, a desparafinação completou-se com duas passagens em xilol, com a duração de 15 minutos cada. Antes de se proceder à coloração, os cortes foram hidratados, fazendo-os passar por banhos de álcool a 90°, a 70° e água destilada.

Na coloração dos cortes usou-se hematoxilina e eosina (H&E), com a seguinte metodologia: Hematoxilina de Harris (Merck®) (4 minutos), imersão em água destilada, imersão em álcool clorídrico (1 ml de ácido clorídrico fumegante p.a., Merck®, em 99 ml de álcool a 70°) seguida da coloração em eosina Gelbich (Merck®) (2 minutos) e novo processo de desidratação (álcool a 95° e a 100°). Por fim, os cortes permaneceram 10 minutos em xilol. Após remover o excesso de xilol, a montagem das preparações histológicas foi efetuada usando uma gota de Entellan® (Merck®).

Na observação histopatológica, as imagens foram estudadas com recurso a um microscópio ótico (Olympus® BX50F).

Resultados

Amostra de Inverno

A amostragem foi realizada em Novembro de 2014. Destinava-se a capturar uma amostra de 30 alburnos para se poder proceder ao diagnóstico parasitário. Apenas foi possível capturar um alburno. Neste alburno não foi observado a presença do céstodo parasita *L. intestinalis*.

Durante a saída foram encontradas medusas de água doce, *Craspedacusta sowerbii*. Estas medusas têm a capacidade de produzir substâncias urticantes, o que pode explicar a ausência de peixes na captura. Estas substâncias podem ter afastado os peixes da zona de profundidade a que são normalmente encontrados.

A medusa, *Craspedacusta sowerbii*

Craspedacusta Sowerbii é uma medusa de água doce, (figura 20) também classificada como um hidrozoário. Esta medusa é originária da bacia do Yangtzé, na China, é uma espécie invasora agora encontrada em água doce e por todo o mundo (Gherardi et al., 2008; Gomes-Pereira e Dionísio, 2013).



Figura 20 – Medusa de água doce, *Craspedacusta sowerbii* (Fonte: microscopy-uk.org.uk)

C. sowerbii têm cerca de 20-25 mm de diâmetro e é muito delicada na fase adulta. Estas medusas têm uma campânula com a possibilidade de possuírem até 400 tentáculos hermeticamente embalados em torno da margem do sino. Pendurado para baixo do centro do interior do sino existe uma estrutura chamada de *manubrium*, com

uma abertura de boca com quatro lábios (Jakocev-Todorovic et al., 2010; Duggan e Eastwood, 2012).

A circulação de nutrientes é facilitada por quatro canais radiais que se originam nos bordos do estômago (*manubrium*), e que também estão ligados a um canal de anel, localizado perto da margem da campânula (Jakocev-Todorovic et al., 2010, Frazão et al., 2011). A maior parte do corpo é transparente ou translúcido, com uma coloração esverdeada ou esbranquiçada (Raposeiro et al., 2010; Duggan e Eastwood, 2012). Os grandes órgãos sexuais estão ligados aos quatro canais radiais, e são geralmente de cor opaca branca. Os tentáculos contêm milhares de células chamadas cnidócitos, que possuem nematocistos, e são usados para capturar presas e transportá-las para a boca (Frazão et al., 2011; RBA, 2011).

C. sowerbii é um predador de zooplâncton, incluindo dáfnias e copépodes. A presa é apanhada com os seus tentáculos urticantes. Com os seus tentáculos estendidos, a medusa aguarda que a presa toque num dos seus tentáculos (Moreno-Leon e Ortega-Rubio, 2009; Frazão et al., 2011). Uma vez que o contato é feito, os nematocistos injetam o veneno que paralisa o animal, e o próprio tentáculo enrola-se ao redor da presa. Os tentáculos, em seguida, trazem a presa para dentro da boca, onde ele é liberado e depois digerido (Xu e Wang, 2009; Frazão et al., 2011).

No entanto, estes cnidócitos são utilizadas para paralisar pequenas presas e não está provado tenham a capacidade para penetrar a pele humana (Gherardi et al., 2008; Frazão et al., 2011, Gomes-Pereira e Dionísio, 2013).

C. sowerbii começa a vida como um pequeno pólipó, que vive em colónias próximas da vegetação subaquática, junto às rochas ou a troncos de árvores, alimentando-se e reproduzindo assexuadamente durante a Primavera e o Verão. Alguns destes descendentes são as medusas que se reproduzem sexualmente (Duggan e Eastwood, 2012; Gomes-Pereira e Dionísio, 2013).

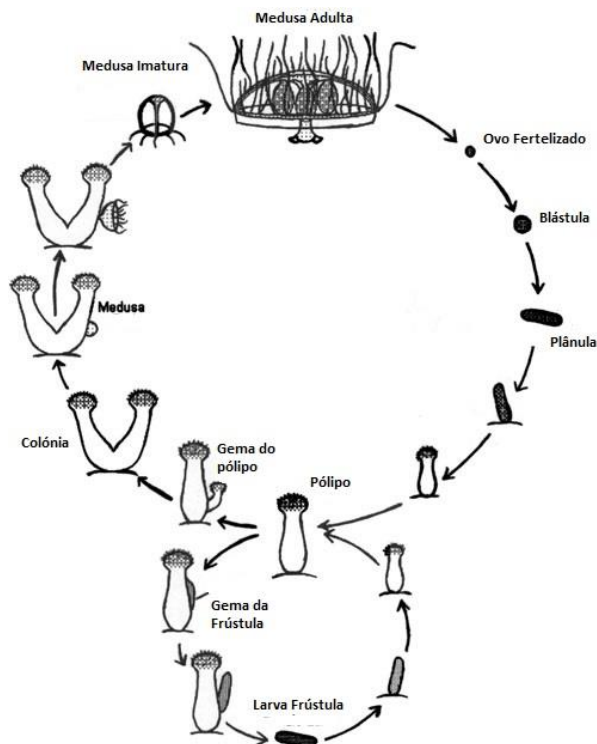


Figura 21 - Ciclo de vida da medusa *Craspedacusta Sowerbii* (adaptado: people.cst.cmich.edu)

Os ovos fertilizados (figura 21) desenvolvem-se em pequenas larvas ciliadas chamadas plânulas. As plânulas depositam-se no fundo e desenvolvem pólipos. No entanto, a maioria das populações de *C. sowerbii* existentes nos Estados Unidos ou são todas do sexo masculino ou todas do sexo feminino, por isso não há reprodução sexuada nessas populações (Bushnell e Porter, 1967; Spadinger e Maier, 1999).

Durante os meses frios de Inverno, os pólipos contraem-se e entram em dormência, chamados podócitos. Acredita-se que podócitos são transportados por plantas ou animais aquáticos para outros corpos de água. Uma vez que as condições se tornam favoráveis, eles desenvolvem em pólipos novamente (Frazão et al., 2011; Duggan e Eastwood, 2012).

Resultados - Amostra de Primavera

Esta amostragem foi realizada em Maio de 2015. Nesta amostra foram capturados através da técnica de arrasto 48 alburnos no total, sendo que 28 estavam frescos, capturados no mesmo dia, e 20 estavam em condições de refrigeração.

Os alburnos frescos tinham peso médio de $18,13 \pm 2,00$ gramas e comprimento médio de $13,23 \pm 0,86$ centímetros. Os alburnos refrigerados tinham peso médio de $17,95 \pm 2,02$ gramas e comprimento médio de $13,5 \pm 2,27$ centímetros. Nesta amostragem pudemos detetar que apenas foi encontrada uma fêmea.

Após efetuada a necrópsia aos alburnos, verificou-se que nenhum dos peixes estava infetado com o parasita *Ligula intestinalis*. Pesquisamos as larvas do parasita (de tonalidade branca e compridos) na cavidade abdominal e a preencher a mesma, comprimindo os órgãos do peixe, tal como observado quando da ocorrência da epizootia (Figura 22).



Figura 22 - Céstodos parasitas *Ligula intestinalis* na cavidade abdominal de alburno (retirado de Ramos et al., 2014)

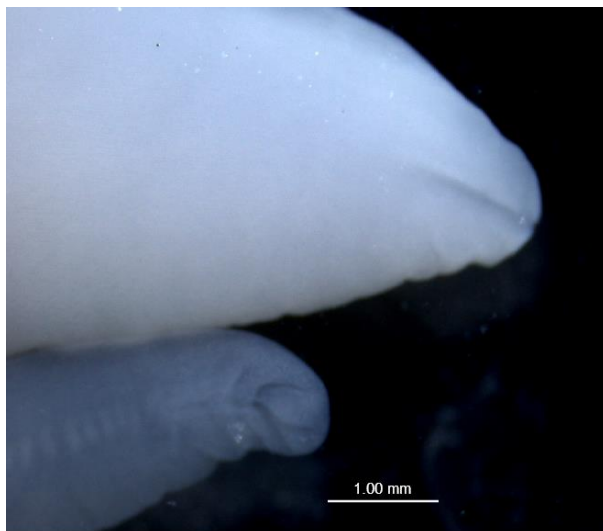


Figura 23 - Larvas plerocercóides. (1) Observar a presença do sulco inter-botridial. Observação à lupa.

A observação das larvas ao microscópio ótico (Figura 23) permitiu observar o seu corpo longo e achatado, em fita e apresentando cor branco opaco. O escólex apresentava-se abobadado e dividido por um sulco, originando duas botrías. (figura 23) Não foi observada a presença de ganchos, ventosas ou tentáculos com armadura. O estróbilo não se apresentava segmentado i.e., dividido em proglótides (Figura 24).



Figura 24 - Larva plerocercóide. Corte transversal. (1) Músculos longitudinais; (2) Folículos vitelinos; (3) canal excretor longitudinal; (4) Primórdio genital. H&E.

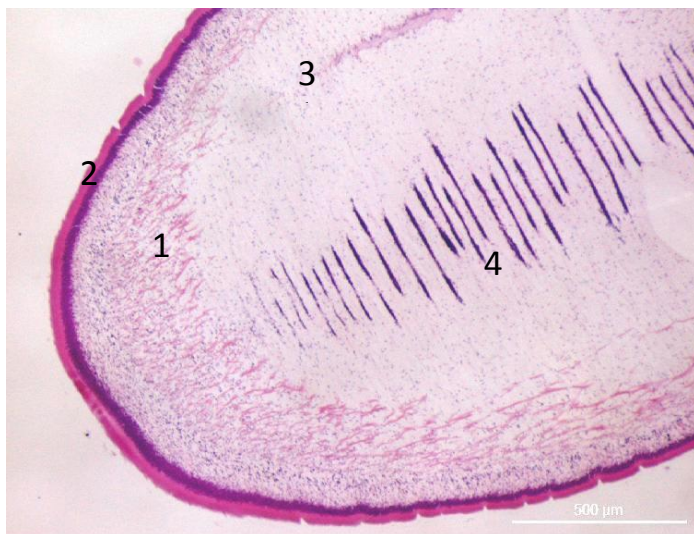


Figura 25 - Ampliação da figura anterior. (1) Músculos longitudinais; (2) cutícula; (3) canal excretor longitudinal; (4) Primórdio genital. H&E.

O corpo das larvas é revestido exteriormente por uma cutícula com 25 µm de espessura, sustentada por uma membrana basal, células sub-cuticulares e músculos longitudinais sub-cuticulares (Figuras 24, 25, 27 e 28). Observaram-se várias camadas de fibras musculares longitudinais sub-cuticulares. Os músculos longitudinais apresentam uma localização profunda no parênquima e na região central do estróbilo encontram-se músculos transversais, que separam o parênquima num tubo interior que contem os órgãos reprodutores. Ao longo da região central do estróbilo observaram-se alguns nervos laterais e o complexo genital disposto numa única série, representando o primórdio genital. (figura 25) Não foi observada a presença de corpúsculos calcários nem de tubo digestivo. Na região cortical estavam presentes folículos vitelinos, bem como canais excretores longitudinais laterais (Figura 26).

A ausência de segmentação do corpo em proglótides com órgãos reprodutores permite identificar estes exemplares como imaturos.

As características morfológicas observadas nos exemplares foram descritas de acordo com Lapage, 1962; Chubb *et al.*, 1987; Bray *et al.*, 1994 e Bruno *et al.*, 2006 e identificadas como sendo larvas plerocercóides de *Ligula intestinalis* (Linnaeus, 1758).

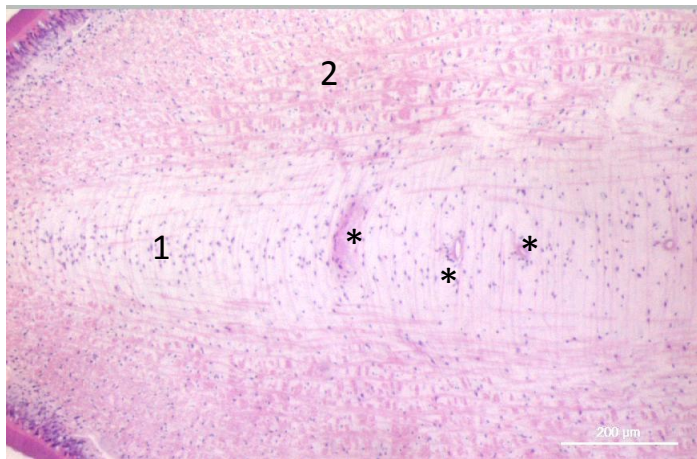


Figura 26 - Estróbilo. Zona medular. (1) Músculos transversais; (2) músculos longitudinais; (*) canais excretores. H&E.



Figura 27 - Larva plerocercóide. (1) cutícula acelular, eosinofílica; (2) sub-cutícula; (3) músculos longitudinais sub-cuticulares; (4) folículos vitelinos. H&E.

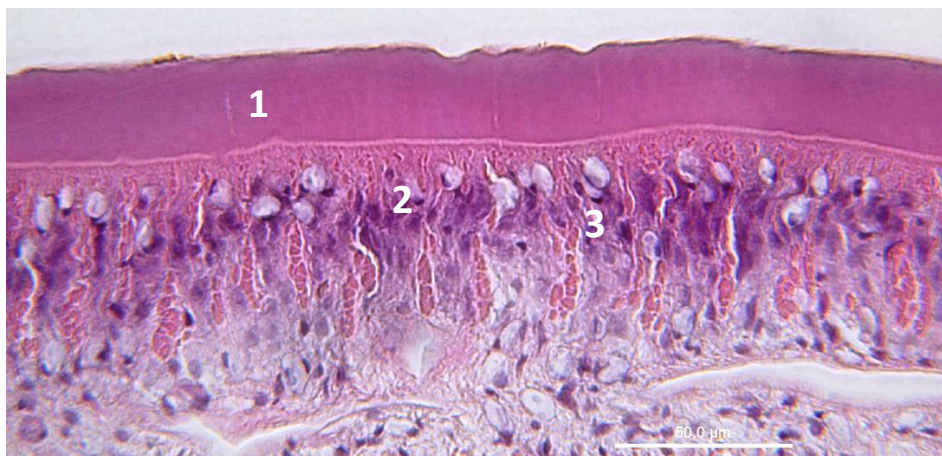


Figura 28 - Larva plerocercóide. (1) cutícula; (2) sub-cutícula; (3) células sub-cuticulares. H&E.

Discussão

A identificação de larvas plerocercóides da ordem Pseudophyllidea não é uma tarefa fácil, uma vez que estas não possuem estruturas sólidas, como por exemplo, os ganchos presentes nas larvas plerocercóides de Tripanorhynchidae (Andersen & Gibson, 1989). Por outro lado, aspetos como a manipulação e as técnicas de fixação empregues (Vik cit. Balbuena & Raga, 1993), bem como a presença de uma cutícula espessa e das camadas de músculos longitudinais e transversais nas larvas mais espessas, dificulta a observação das características morfológicas nos cortes histológicos e, consequentemente, a sua identificação.

As larvas estudadas encontravam-se livres nas cavidades abdominais do corpo dos alburnos, peixes ciprinídeos, contrariamente às larvas plerocercóides de *D. latum* que são encontradas livres na musculatura somática ou enquistadas nas vísceras de peixes predadores (Chubb *et al.*, 1987). A estriação do corpo nas larvas plerocercóides de *D. latum* é geralmente observável imediatamente a seguir ao escólex (Chubb *et al.*, 1987). Estas larvas possuem duas bótrídias distintas e inúmeros folículos vitelogénicos dispostos numa única camada ao longo dos proglótides (Bray *et al.*, 1994) e apenas uma única camada de fibras musculares longitudinais sub-cuticulares (Andersen & Gibson, 1989). Nas larvas estudadas, uma única série de complexos genitais encontra-se ao longo do estróbilo representando os órgãos genitais primordiais, de acordo com a representação esquemática de Dubinina (Bray *et al.*, 1994), os folículos vitelinos encontravam-se entre os músculos longitudinais e foram também observadas várias camadas de fibras musculares longitudinais sub-cuticulares. Nos cortes histológicos, os céstodos assemelham-se aos tremátodos, mas existem algumas características distintas que permitem diferenciá-las (Bruno *et al.* 2006): As larvas plerocercóides possuem corpúsculos calcários, que estão ausentes nas metacercárias. Nos exemplares estudados não foram observados corpúsculos calcários, eventualmente removidos durante o processamento histológico dos tecidos. As metacercárias têm ventosas ventrais para se fixarem ao hospedeiro, para além da ventosa oral, enquanto que nas larvas plerocercóides a fixação é feita através do escólex. Nas larvas plerocercóides não existe tubo digestivo, pois alimentam-se através de poros presentes na superfície do corpo e por outro lado, têm uma cutícula mais espessa que as metacercárias. As camadas musculares que nos tremátodos estão localizadas imediatamente abaixo da cutícula, nas larvas plerocercóides localizam-se no parênquima profundo.

As características morfológicas dos espécimes estudados e a sua ocorrência em ciprinídeos permitiu diferenciá-los de outros céstodos e tremátodos e identificá-los como larvas plerocercóides de *Ligula intestinalis* (Linnaeus, 1758).

Conclusão

A albufeira da barragem de Castelo de Bode é um ponto estratégico em termos de abastecimento de água, produção de energia elétrica e proteção de cheias e também atividades recreativas. Devido à elevada importância desta zona o estudo da parasitose foi fundamental para concluir que o parasita encontrado se tratava do céstodo *Ligula intestinalis*.

As características morfológicas identificadas nos cortes histológicos, nomeadamente a ausência de segmentação do corpo, a apresentação de uma única série de complexos genitais que se encontravam ao longo do estróbilo representando o primórdio genital, os folículos vitelinos presentes entre os músculos longitudinais, a presença de várias camadas de fibras musculares longitudinais sub-cuticulares e porque apenas os alburnos, ciprinídeos estavam infetados com este parasita e também a localização do parasita nestes peixes permitiram fazer o diagnóstico diferencial com tremátodos (nos cortes histológicos) e com o céstodo *D. latum*, tendo sido identificado como tratando-se de larvas plerocercóides de *Ligula intestinalis*.

Bibliografia

- Abowei, J. F. N. and Ezekiel, E. N., 2011, Trematoda, Tape Worms: Infections by Larval and Other Tape Worms; and Nematoda in African Fish (A Review), *International Journal of Animal and Veterinary Advances* 3(5): 352-366, 2011
- Ahmadiara, E., Hosseini, S.H., Jalousian, F., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Sakhaifar, S. and Gerami Sadeghian, A., 2013, The study of the plerocercoid of *diphyllbothriidae* (cestoda, pseudophyllidea) in two cyprinid hosts, *Abramis brama* and *Alburnoides bipunctatus* from north and northwest of Iran, *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 7(2): 103-109.
- Andersen, K. I. and Gibson, D. I., 1989, A key to three species of larval *Diphyllbothrium* *Cobbold*, 1858 (Cestoda: Pseudophyllidea) occurring in European and North American freshwater fishes, *Systematic Parasitology*, 13(1): 3-9.
- Andersen, K., 1975b, Comparison of surface topography of three species of *Diphyllbothrium* (Cestoda, Pseudophyllidea) by scanning electron microscopy, *International Journal for Parasitology*, 5: 293–300.
- Andersen, K., 1987, A redescription of *Diphyllbothrium stemmacephalum* *Cobbold*, 1858 with comments on other marine species of *Diphyllbothrium* *Cobbold*, 1858, *Journal of Natural History*, 21: 411–427.
- Andersen, K., Ching, H. L. and Vik, R., 1987, A review of freshwater species of *Diphyllbothrium* with redescrptions and the distribution of *D. dendriticum* (Nitzsch, 1824) and *D. ditremum* (Creplin, 1825) from North America, *Canadian Journal of Zoology*, 65: 2216–2228.
- APA, 2002, Revisão do Plano de Ordenamento da Albufeira de Castelo de Bode.
- Arme, C. and Owen, R. W., 1968, Occurrence and pathology of *Ligula intestinalis* infections in British fishes, *The Journal of Parasitology*, 50(2): 272-280.
- Arme, C. and Owen, R. W., 1970, Observations on a tissue response within the body cavity of fish infected with the plerocercoid larvae of *Ligula intestinalis* (L.) (Cestoda: Pseudophyllidea), *Journal of Fish Biology*, 2(1): 35-37.
- Assis, A. B., Barletta, L., Braga, L. R. A., Franco, D. G., Frazão, A. H., Gome, A. D., Honji, R. M., Lapa, M. A. P. C., Madeleire, C. B., Monteiro, S. C. G., Orts,

- D. J. B. and Toledo, M. A. F., *Tópicos em Fisiologia Comparativa*, Instituto de Biociências Universidade de São Paulo, Brasil, 2011.
- Balata, F., Devlin, S., Esteban, A. and Crilly, R., Fish dependence - 2014 update: the reliance of the EU in fish from elsewhere, New Economics Foundation, consultado a 22 de Março de 2015, <http://www.neweconomics.org/publications/entry/fish-dependence-2014-update>.
 - Balbuena, J. A. and Raga. J. A., 1993, Diphyllbothriids (Cestoda: Pseudophyllidea) from the long-finned pilot whale *Globicephala melas* (Traill, 1809) off the Faroe Islands, with comments on the taxonomy of *Diphyllbothrium Cobbold*, 1858 species from cetaceans, *Systematic parasitology* 26: 117-126.
 - Barber, I., Hoare, D., and Krause, J., 2000, Effects of parasites on fish behaviour a review and evolutionary perspective, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 131-165.
 - Bauer, O. N., 1959, The ecology of freshwater fish. Inves. Gosud. Nauch-Issled. Inst. Ozer. Rech. Ryb. Khoz. 49: 5-206 (In Russian, English translated by Israel Program Science Transmission. cat. No. 622, 1962, 3-215).
 - Bean, C. W. and Winfield, I. J., 1989, Biological and ecological effects of a *Ligula intestinalis* (L.) infestation of the gudgeon, *Gobio gobio* (L.), in Lough Neagh, Northern Ireland, *Journal of Fish Biology*, 34(1): 135-147 .
 - Bouzid, W., Stefka, J., Bahri-Sfar, L., Beerli, P., Loot, G., Lek, S., Haddaoui, N., Hypsa, V., Scholz, T., Dkhil-Abbes, T., Meddour, R. and Kalthoum Ben Hassine, O., 2013, Pathways of cryptic invasion in a fish parasite traced using coalescent analysis and epidemiological survey, *Biological Invasions*, 15(9): 1907-1923.
 - Bouzid, W., Stefka, J., Hypsa, V., Lek, S., Scholz, T., Legal, L., Ben Hassine, O. K. and Loot, G., 2008, Geography and host specificity: Two forces behind the genetic structure of the freshwater fish parasite *Ligula intestinalis* (Cestoda: Diphyllbothriidae), *International Journal for Parasitology*, 38: 1465-1479.
 - Bray, R. A., Jones A. and Andersen, K. I., 1994. Order Pseudophyllidea Carus, 1863. In: *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates*. (Khalil LF, Jones A & Bray RA, Eds), pp. 205-247. International Institute of Parasitology. CAB INTERNATIONAL.
 - Brown, S. P., Loot, G., Teriokhinb, A., Brunel, A., Brunel, C. and Guegan, J.-F. , 2002, Host manipulation by *Ligula intestinalis* a cause or consequence of parasite aggregation, *International Journal for Parasitology*, 32 (7): 817-824.

- Bruno, D. W., Nowak, B. and Elliott, D. G., 2006. Guide to the identification of fish protozoan and metazoan parasites in stained tissue sections. *Dis Aquat Organ*; 70:1-36.
- Bushnell, J. H. J. and Porter, T. W., 1967, The Occurrence, Habitat, Prey, of *Craspedacusta sowerbii* in Michigan, Transactions of the American Microscopical Society, 86(1): 22-27.
- Carter, V., Pierce, R., Dufour, S., Arme, C. and Hoole, D., 2005, The tapeworm *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidea) inhibits LH expression and puberty in its teleost host, *Rutilus rutilus*, *Reproduction*, 130(6): 939-945.
- Carvalho-Varela, M., 2005, Helmintosos Internas. In: *Parasitas e Parasitoses em Piscicultura*, Editor: Ordem dos Médicos Veterinários. 11: 405-523.
- Chubb, J. C., Pool, D. W. and Veltkamp, C. J., 1987, A key to the species of cestodes (tapeworms) parasitic in British and Irish freshwater fishes, *Journal of Fish Biology*, 31(4): 517-543.
- Ciutti, F., Beltrami, M. E., Confortini, I., Cianfanelli, S. and Cappelletti, C., 2011, Non-indigenous invertebrates, fish and macrophytes in Lake Garda (Italy), *Journal of Limnology*, 70(2): 315-320.
- Conradt, U. and Jiirgen Schmidt, 1992, A double surface membrane in plerocercoids of *Ligula intestinalis* (Cestoda Pseudophyllidea), *Parasitology Research*, 78: 123-129.
- deVos, T. and Dick, T. A., 1989, Differentiation between *Diphyllbothrium dendriticum* and *D. latum* using isozymes, restriction profiles and ribosomal gene probes, *Systematic Parasitology*, 13: 161–166.
- deVos, T., Szalal, A. J. and Dick, T. A., 1990, Genetic and morphological variability in a population of *Diphyllbothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824), *Systematic Parasitology*, 16: 99–105.
- Duggan, I. C. and Eastwood, K. R., 2012, Detection and distribution of *Craspedacusta sowerbii*: Observations of medusae are not enough, *Aquatic Invasions*, (2): 271-275.
- Eckmann, R., Mörtl, M., Baumgärtner, D., Berron, C., Fischer, P., Schleuter, D. and Weber, A., 2008, Consumption of amphipods by littoral fish after the replacement of native *Gammarus roeseli* by invasive *Dikerogammarus villosus* in Lake Constance, *Aquatic Invasions* 3, 2: 187-191.
- Eiras, J.C., 1994, Elementos de Ictioparasitologia, Fundação Eng. António de Almeida. 339p.

- Ergonul, M. B. and Altindag, A., 2005, The occurrence and dynamics of *Ligula intestinalis* in its cyprinid fish host, tench, *Tinca tinca*, in Mogan Lake (Ankara, Turkey), International Journal for Veterinary and Biomedical Science, 50(12): 537-542.
- Ferreira, M. T., 1985, Occurrence freshwater medusa in portuguese reservoirs, Boletim da Sociedade Portuguesa de Ciências Naturais, 22: 41-46.
- Fishbase, *Alburnus alburnus*, consultado em 12 de Abril de 2015 - <http://www.fishbase.org/summary/4730>
- Fukumoto, S., Yazaki, S., Nagai, D., Takechi, M., Kamo, H. and Yamane, Y., 1987, Comparative studies on soluble protein profiles and isozyme patterns in 3 related species of the genus *Diphyllbothrium*, Japanese Journal of Parasitology, 36: 12–20.
- Garcia-Berthou, E., Boix, D. and Clavero, M., 2007, Non-indigenous animal species naturalized in Iberian inland waters, Biological Invaders in Inland Waters, 2: 123-140.
- Gherardi, F., Gollash, S., Minchin, D., Olenin, S. and Panov, V. E., 2008, Alien Invertebrates and Fish in European Inland Water, Handbook of Alien Species in Europe, 3: 81-92, Series Editor: James A. Drake, University of Tennessee, Knoxville, USA.
- Gomes-Pereira, J. N. and Dionísio, G., 2013, *Craspedacusta sowerbii* Lankester, 1880 in southern Portugal, BioInvasions Records, 2(2): 133–136.
- Harris, M. T. and Wheeler, A., 1974, Ligula infestation of bleak *Alburnus alburnus* (L.) in the tidal Thames, Journal of Fish Biology, 6(2): 181-188.
- Hoole, D. and Arme, C., 1988, *Ligula intestinalis* (Cestoda Pseudophyllidea) phosphorylcholine inhibition of fish leucocyte adherence, Diseases of Aquatic Organisms, 5: 29-33.
- İnnal, D., Erk'akan, F. and Keskin, N., 2010, The Dynamics of the *Ligula intestinalis* (Cestoda Pseudophyllidea) in Three Cyprinid Species: *Alburnus escherichii* (Steindachner, 1897) *Gobio gobio* (Linnaeus, 1758) and *Squalius cephalus* (Linnaeus, 1758)], Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 38(4): 319-324.
- İnnal, D., Keskin, N. and Erk'akan, F., 2007, Distribution of *Ligula intestinalis* (L.) in Turkey, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 7: 19-22.
- Jakoccev-Todorovic, D., Dikanovic, V., Skoric, S. and Cakic, P., 2010, Freshwater jellyfish *Craspedacusta sowerbyi* Lankester, 1880 (Hydrozoa,

- Olindiaae) 50 years of observations in Serbia, Archives of Biological Science Belgrade 62(1): 123-127.
- Janovy, J. and Roberts, L. S., 2005, Foundations of Parasitology (7th ed.). McGraw-Hill Education (ISE Editions – pp. 702)
 - Kerr, K., 2004, Zoonoses. Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans, Journal of Clinical Pathology, 57(10): 1118-1120.
 - Ko, S. B., 2008, Observation of deworming process in intestinal *Diphylobothrium latum* parasitism by Gastrografin injection into jejunum through double-balloon enteroscope, American Journal of Gastroenterology, 103: 2149-2150.
 - Korkmaz, A. S. and Zencir, O., 2009, Annual Dynamics of Tapeworm, *Ligula intestinalis* Parasitism in Tench (*Tinca tinca*) from Beysehir Lake, Turkey, Journal of Animal and Veterinary Advances, 8(9): 1790-1793.
 - Koyun, M., 2006, The seasonal Effects of *Ligula intestinalis* L. (Cestodes: Pseudophyllidae) on *Alburnus alburnus* (Cyprinidae), International Journal of Zoological Research, 2(1): 75-76.
 - Lapage G. 1962. *Veterinary Helminthology and Entomology*. Fifth edition. 600p. London Baillière, Tindall and Cox.
 - Llaguno, M. M., Cortez-Escalante, J., Waikagul, J., Faleiros, A. C. G., Chagas, F., and Castro, C., 2008, *Diphylobothrium latum* infection in a non-endemic country: case report, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 41(3): 301-303.
 - Loot, G., Brosse, S., Lek, S. and Guégan, J.-F., 2001, Behaviour of roach (*Rutilus rutilus* L.) altered by *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidea): a field demonstration. Freshwater Biology, 46(9): 1219-1227.
 - Loot, G., Lek, S., Brown, S. P. and Guégan, S.-F., 2001, Phenotypic modification of roach (*Rutilus rutilus* L.) Infected with *Ligula intestinalis* L. (cestoda: pseudophyllidea), The Journal of Parasitology, 87(5): 1002-1010.
 - Loot, G., Pascal, F., Frédéric, S., Sovan, S. and Guegan, J.-F., 2001, The three hosts of the *Ligula intestinalis* (Cestoda) life cycle in Lavernose-Lacasse gravel pit, France, Archiv fur Hydrobiologie, 152(3): 511-525.
 - Mahbobeh, H., 2008, The Occurrence and Parasite-Host of *Ligula intestinalis* in Sattarkhan Lake (East Azerbaijan-Iran), Journal of Animal and Veterinary Advances, 7(3): 221-225.

- Mitchell, A. J. and Hoffman, G. L., 1980. Important tapeworms of North American freshwater fishes. US Dep. Int. Fish & Wildlife Serv. Fish Dis. Leaflet, 59: 17
- Moreno-Leon, M. A. and Ortega-Rubio, A., 2009, First record of *Craspedacusta sowerbyi* Lankester, 1880 (Cnidaria Limnomedusae Olindiidae) in Mexico (Adolfo Lopez Mateos reservoir), with notes on their feeding habits and limnological dates, *Biological Invasions*, 11(8): 1827-1834.
- Ramos P., Oliveira, M. M., Grade, A., Rosa, F., Portugal e Castro, M. I. and Alexandre-Pires, G., 2014. Mortalidade de Alburnos, *Alburnus alburnus* na Albufeira de Castelo de Bode, associada a *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidae). *Acta Parasitológica Portuguesa*. vol. 20 (1/2): 55-60. (in Portuguese. Abstract in english).
- Raposeiro, P. M., Ramos, J. C., and Costa, A. C., 2010, First record of *Craspedacusta sowerbii* Lankester in Azores, *Life and Marine Sciences*, 28: 11-13.
- River Basins, Rapid Biological Assessment (RBA) based on analysis of benthic macroinvertebrate communities Environmental Protection of International River Basins Project, consultado em 24 de Abril de 2015, http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:ZIKDg09EkkUJ:black-sea-riverbasins.net/system/files_force/Rapid_Bioassessment_English_Oct%25202013.pdf%3Fdownload%3D1+&cd=2&hl=pt-PT&ct=clnk&gl=pt
- Rodríguez, S. R., Servia, M. J., Vieira-Lanero, R. and Cobo, F., 2010, Vectores, antigüedad y procedencia de las especies alóctonas de agua dulce naturalizadas en Galicia Nova Ata Científica Compostelana, 19: 49-67.
- Shields, B. A., Groves, K. L., Rombaugh, C. and Bellmore, R., 1976, Ligulosis associated with mortality in largescale suckers, *Journal of Fish Biology*, 61(2): 448-455.
- Silva, M. N. J. J. L., 2005, Associations between medusae (Cnidaria) and isopods (Crustacea) at the littoral of Paraná and Santa Catarina State, Brazil, *Acta Biológica Paranaense*, 34(1,2,3,4): 127-138.
- Spadinger, R. and Maier, G., 1999, Prey selection and diel feeding of the freshwater jellyfish, *Craspedacusta sowerbyi*, *Freshwater Biology*, 41: 567–573.
- Stefka, J., Hypsa, V. and Scholz, T., 2009, Interplay of host specificity and biogeography in the population structure of a cosmopolitan endoparasite

- microsatellite study of *Ligula intestinalis* (Cestoda), *Molecular Ecology*, 18(6): 1187-1206.
- Sweeting, R. A., 1976, Studies on *Ligula intestinalis* (L.) effects on a roach population in a gravel pit. *Journal of Fish Biology*, 9: 515-522.
 - Sweeting, R. A., 1977, Studies on *Ligula intestinalis*. Some aspects of the pathology in the second intermediate host. *Journal of Fish Biology*, 10: 43-50.
 - Tizie, E., Baye, D. and Mohamed, A., 2014, Prevalence of *Ligula intestinalis* Larvae in Barbus Fish Genera at Lake Tana, Ethiopia, *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 6(5): 408-416.
 - Trubiroha, A., Wuertz, S., Frank, S. N., Sures, B. and Kloas, W., 2009, Expression of gonadotropin subunits in roach (*Rutilus rutilus*, Cyprinidae) infected with plerocercoids of the tapeworm *Ligula intestinalis* (cestoda), *International Journal for Parasitology* 39: 1,465-1,473.
 - Vinyoles, D., Robalo, J. I., Sostoa, A., Almodóvar, A. M., Elvira, B. Nicola, G. G., Fernández-Delgado, C., Santos, C. S., Doadrio, I., Sardá-Palomera, F., and Almada, V. C., 2007, Spread of the alien bleak *Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758) (Actinopterygii cyprinidae) in the Iberian Peninsula: The role of reservoirs, *Graellsia*, 63(1): 101-110.
 - Weekes, P. J. and Penlington, B., 1986, First records of *Ligula intestinalis* (Cestoda) in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and common bully, *Gobiomorphus cotidianus*, in New Zealand, *Journal of Fish Biology*, 28(2): 183-190.
 - Xu, S., and Wang, D., 2009, Life Cycle of *Craspedacusta sowerbyi xinyangensis*, *Current Zoology*, 55(3): 227-234.



universidade de aveiro

CONTROL OF FISH PARASITE *Anisakis* BY PHOTODYNAMIC REACTIONS

Paula Ramos¹, Pedro Silva¹, Ana Grade¹, Maria G. P. S. Neves², M. A. F. Faustino², Adelaide Almeida³

mail: aalmeida@ua.pt

¹Division of Aquaculture and Upgrading, Portuguese Institute for Sea and Atmosphere, Avenue Brasília, 1449-006 Lisbon, Portugal

²Department of Chemistry & QOPNA, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

³Department of Biology and CESAM, University of Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193, Aveiro, Portugal



INTRODUCTION

Anisakiosis is a widely distributed zoonosis produced by the third larvae stage (L3) of nematodes of the genus *Anisakis* associated with fish consumption. The popularity of eating raw-fish dishes or the ingestion of seafood that has been cooked for short periods will increase the risk of ingestion of parasitized fish with live larvae. The presence of live *Anisakis* larvae can give rise to two differentiated diseases, infection (anisakiosis) of the digestive tract, or occasionally in other organs, and allergic reactions with or without digestive symptoms. There is no effective treatment against human anisakiosis. In order to test if photodynamic inactivation (PDI), can be used to inactivate *Anisakis*, in the present study, a cationic porphyrin PS, with biocidal activity against different pathogens, was tested on *Anisakis* larvae.

MATERIAL AND METHODS

Anisakis larvae

Anisakis larvae (type I, L3) were obtained from mackerel, *Trachurus trachurus* from the Portuguese Coast (Fig. 1a). Parasites were collected from the internal organs by dissecting the fish (Fig. 1b) and identified under optical microscope after removing debris adhering to the cuticle. Twenty larvae were used for each assay (Fig. 1c).

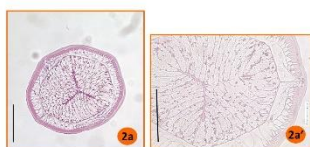
In vitro assay

Larvae were exposed in phosphate-buffered saline (PBS) at two different PS concentrations (5 and 50 μM) and white light irradiances (4 and 14 mW/cm^2) for 8 h. The protocol involved 10' incubation with porphyrin doses before the assay. The treatments were performed with three biological replicates. In all, 20 larvae were incubated with each solution.

A light (irradiated in the absence of PS) and dark (incubated with PS but non-irradiated) controls were included in each assay.

The viability of larvae was evaluated every 2 hours during a total of 15 hours. Larvae with no mobility at all were considered dead.

Histological studies of larval were done at the end of the assay, in order to evaluate tissue damage. Larvae were fixed with 10% formalin buffered and mounted as 3 μm thick sections transversally cut through different levels. Hematoxylin-eosin (H&E) stained preparations were examined by microscope.



RESULTS

- *Anisakis* larvae were not inactivated at the lower PS concentration and light irradiation (5 μM , 4 mW/cm^2).
- At highest concentration and light irradiance (50 μM , 14 mW/cm^2) all the parasites dead.
- None of the larvae of both controls of the highest concentration died, but some broadening of the intestinal lumen were observed in three dark control nematodes. Although some of the alterations observed by the dead larvae can be due to the ingestion of the PS, as it was observed in the dark control larvae, but the dead was caused by the photodynamic process (dead only occurred after irradiation).

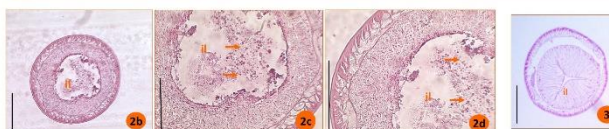


Fig. 2 Histological damage produced to L3 of *A. simplex* s.l. by *in vivo* treatment with 50 μM PS and 14 mW/cm^2 irradiation. (2a) Light control. (2a') Dark control. (2b, 2c and 2d) larvae: Destruction of the digestive tract towards the outside. (il - intestinal lumen; \rightarrow cellular material). H&E. Bar: 25 μm . Fig.3 Larvae treated with 5 μM PS and 4 mW/cm^2 irradiation.

- Histological study revealed that the highest PS concentration affect the intestine of the parasites, produce the rupture of its wall causing broadening of the intestinal lumen with the presence of cellular material (Fig 2b, 2c, 2d).
- The rupture of the intestinal wall could be due to the possible *per os* entry of the compound in the L3 larvae which is strengthened by the histological intestinal alterations.

CONCLUSIONS

According to these results, antimicrobial photodynamic therapy can be considered an alternative option to prevent anisakiosis. Further studies are required to investigate whether addition of these compounds to seafood products could have a prophylactic effect, reducing the pathogenicity of *A. simplex* s.l. in humans.

Trabalho apresentado no 16th Congress of the European Society for Photobiology. 31 Agosto – 4 Setembro de 2015. Aveiro (Portugal). PO44.